

**MECANISMOS DE ACTIVACIÓN  
MICROGLIAL EN DEGENERACIÓN  
DOPAMINÉRGICA: PAPEL DEL EJE  
ANGIOTENSINA/AT1/RHO QUINASA**

**ANA BORRAJO LÓPEZ**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA**

**SANTIAGO DE COMPOSTELA  
2015**

**MECANISMOS DE  
ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN  
DEGENERACIÓN  
DOPAMINÉRGICA: PAPEL DEL  
EJE ANGIOTENSINA/AT1/RHO  
QUINASA**

**ASDO. ....**

**ANA BORRAJO LÓPEZ**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
NEUROCIENCIA**

**SANTIAGO DE COMPOSTELA  
2015**



**Fotografía de portada:** imagen de la línea celular microglial murina N9 mostrando la colocalización con el anticuerpo OX-42 (marcador de microglía en verde) y Hoechst (núcleos en azul)

# **MECANISMOS DE ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA: PAPEL DEL EJE ANGIOTENSINA/AT1/RHO QUINASA**

Tesis doctoral presentada por  
**Ana Borrajo López**

Directores:

**Jose Luis Labandeira García**  
Catedrático de Anatomía Humana

**Ana Isabel Rodríguez Pérez**  
Profesora Contratada Interina

Departamento de Ciencias Morfológicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, 2015





**D. José Luis Labandeira García**, Catedrático de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y **Dña. Ana Isabel Rodríguez Pérez**, Profesora Contratada Interina por Vacante de la misma Universidad,

HACEN CONSTAR QUE:

**Dña. Ana Borrajo López** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral **Mecanismos de activación microglial en degeneración dopaminérgica: papel del eje Angiotensina/AT1/Rho quinasa** y que dicho trabajo reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado para su valoración por la comisión correspondiente.

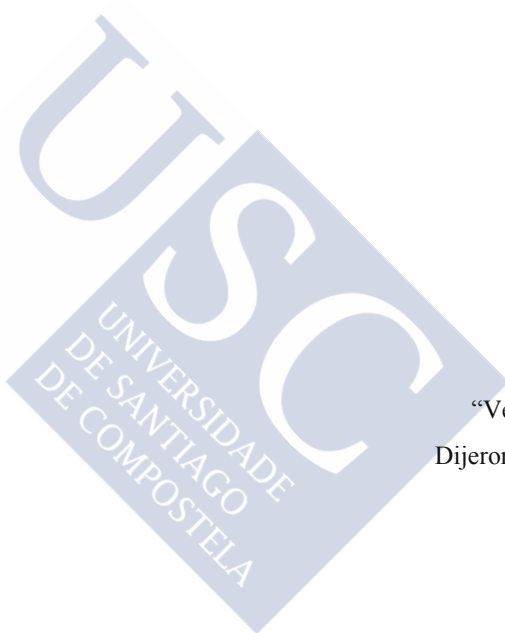
Y para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmamos en Santiago de Compostela, a 28 de Septiembre de 2015.

**José Luis Labandeira García**  
Catedrático de Anatomía Humana  
Dpto. de Ciencias Morfológicas

**Ana Isabel Rodríguez Pérez**  
Profesora Contratada Interina  
Dpto. de Ciencias Morfológicas

**Ana Borrajo López**





“Venid al borde”, dijo.

Dijeron: “tenemos miedo”

Fueron

Les empujó y...

Volaron!

**Apollinaire**

**A mi padre**



## **Agradecimientos.**

Lamento que mis agradecimientos vayan a ser muy extensos pero no he podido reducirlos más. En ellos describo mis sentimientos hacia toda la gente que me ha aportado tanto y me ha hecho crecer como persona y como la profesional en la que me estoy convirtiendo. Todas y cada una de las personas que nombro, en mayor o menor medida, han hecho posible la realización de esta tesis.

En primer lugar quisiera agradecer al profesor **José Luis Labandeira** la oportunidad que me ha dado de formar parte de su equipo y de seguir en la investigación y sobre todo por la ilusión, el empeño y la dedicación que demuestra en cada uno de los proyectos que lleva a cabo.

A la profesora **M<sup>a</sup> Josefa Guerra** por la buena acogida a mi llegada y por el afecto recibido. Por enseñar siempre con la afabilidad y gentileza que te caracteriza.

A la profesora **Ana I**, mi codirectora, por tus consejos, por tu optimismo, por el trabajo y las ganas que le pones a todas las cosas y por el sacrificio que supone venir al laboratorio en días festivos, fines de semana, vacaciones..., por la capacidad de subirme la moral y por un montón de cosas más GRACIAS!!!!

### **A mis compañeros de laboratorio:**

- a **Alicia** por el entusiasmo que muestras en el labo. Sigue así y no lo pierdas nunca incluso ante las dificultades que se te van a presentar.
- A **Ana M.** por tu dulzura, por tu saber estar, por tu simpatía y por escucharme en mis momentos bajos. Por tu respeto. Muchas gracias Ana!
- A **Antonio** por tu disponibilidad y por ser tan buen camarada de fatigas (tratamientos, cultivos de microglía, astrocitos....) porque hacemos de un trabajo tedioso una mañana divertida ;-). Por tu paciencia ante mis despistes y por todo lo que he aprendido contigo.
- A **Begoña Villar** por tu visión positiva de la vida, por tus buenas recomendaciones cargadas de energía, por la tu talento para rebatirlo todo, por ser incansable y por estar dispuesta siempre a echar una mano con todo lo que sabes.

- A **Carmen**, porque a pesar de nuestras riñas, el cariño y el aprecio mutuo queda patente siempre.
- A **Clynton** por tu sonrisa, tu educación, tu tranquilidad, tu adaptación a un país diferente al tuyo, por tener tan buen carácter y por gustarte tanto el café☺. Estoy muy contenta de haberte conocido y te voy a echar muchísimo de menos☹ aunque me queda por conocer la bandera de Minas Gerais “Libertas Quæ Sera Tamen” ;-).
- A **Iria** por tu profesionalidad, por tu perfeccionismo, por intentar organizar todo aunque con algunos sea CASI imposible, jajaja. Porque eres muy buena (a todos los niveles) y me alegro de haber contado contigo en esta etapa de mi vida y de contar contigo en el futuro.
- A **Jannette** por todo lo que me has formado, por tu rigor para realizar experimentos y porque detrás de una fachada, a veces un poco severa, se esconden muy buenas intenciones y un buen corazón.
- A **Jose** por tu detallismo, por tu humor, por malacostumbrarnos a no rellenar ni una sola punta y a tener siempre el fregadero libre. Por nuestros bailes y por los homenajes que le hemos hecho a los más gandes: Ana Kiro, la duquesa de Alba y muchos más... jajaja.
- A **Juan** por la confianza que inspiras, por el esfuerzo que inviertes en todo lo que haces y por tus buenos deseos hacia todo el mundo. Gracias por ser tan buen compañero y tan buena persona.
- A **Martu** por tu impulsividad y por ser siempre tan directa. Aunque no te conozco demasiado, son dos cosas que, a pesar de que *a priori*, pueden parecer defectos para mí son características vitales y las valoro mucho en una persona.
- A **Pablo Garrido** por tu aplomo, por tu esmero en hacer las cosas bien, por tu ayuda inestimable gracias a tu habilidad con los microscopios☺, por la gracia que derrochas en los momentos de distensión y en las cenas, sobre todo en las que hay chupitos... jajaja; gracias navarrica.
- A **Pili** por ser mi confidente, por ser mi AMIGA, por estar siempre a mi lado en los buenos y en los malos momentos, por el respaldo incondicional que me has demostrado y por ser en una palabra INDISPENSABLE para mí en el labo.
- A **Rita** por tu serenidad, tu discreción, tu silencio y tu reflexión.
- A **Begoña González** por tu cordialidad, tu madurez, tu valentía para afrontar los cambios y contratiempos. Por ser tan servicial y cumplidora.

- A **Belén** por tu cortesía, por tu incesante anhelo de cambiar las cosas, por tus malos momentos que no han sido en vano. Espero que tengas mucha suerte allá donde vayas porque te lo has ganado.
- A **Pablo Rey** por ser incorregiblemente único y sencillamente genial. Porque aunque ya no estás en el laboratorio sigues siendo mi AMIGO. Gracias por todo!
- A **Bernardo**, porque aunque no perteneces directamente al grupo formas parte destacada de todo esto, por tu ingenio, por ser tan humano y campechano, por “non estar morto e estar de parranda”... jajaja y por tu gran disposición y orden con los animales.
- También se merecen una particular mención toda la gente de FP, TFG, TFM e intercambio como **Héctor**, **Chiara**, Martu (ahora ya en el grupo como predoc) y todos con los que he tenido un mayor trato y que han hecho mi paso por el laboratorio mucho más ameno.

En especial quería agradecer a **mi madre** y a **mi hermano** por todo lo que habéis hecho por mí porque no sabéis lo mucho que os debo. A **Tore** por tu armonía, tu aguante ante mis ataques de locura, por tu protección, por tu anhelo a una vida juntos, por tu generosidad, por tu bondad y por tantas otras cosas.... GRAZIE SOLE, CUORE, AMORE!!!!!!!!!!

Alla mia famiglia italiana; a Nina e Peppino per la bontà con cui mi accolgono sempre; a Martina per essere sempre tanto dolce con me; a Giovvy perché non posso fare altro che ammirare la sua gioia. Voglio anche ringraziare Daniele perché è molto bravo e sono sicura che le cose andranno meglio; purtroppo la vita non sempre è perfetta. A Cinzia per la sua simpatía e disponibilità.

A mis compis de piso, **Núria y Emi** y a mis amigas **Mercedes, Puri y Tere** ya que sin vosotros mi paso por Santiago no estaría cargado de tantas anécdotas tan divertidas, de esa fuerza y vitalidad que necesito para seguir adelante y de la posibilidad que me dais de desahogarme cuando estoy hasta arriba.

A mis amigos del Labo 10 de Reuma del hospital: **Ari, Aida, Cris, Eli, Manolo, Marián, May y Romi**. Por como sois, por la estima que me demostráis cada vez que nos juntamos y que nos vemos. **Ari**, por ser mi rubia favorita; **Aida**, ánimo con la tesis que ya no queda na; **Cris**, somos fuertes...podemos con lo que nos echen; **Eli**, a ver cuándo me invitas a tierras suecas que te lo estás reservando todo para ti; **Manolo** eres un crack y un “buenorro”,



jajajaj; **Mari**, tenemos que volver a retomar nuestras salidas, Ourense nos espera; **May** por tu alegría, por tu salero andaluz, por tus palabras de aliento ; **Romi**, estoy segura de que te está yendo estupendamente en esta nueva etapa de tu vida, porque te lo mereces. También incluyo en este grupo a **Isa** por tus recomendaciones cargadas de positivismo y por tu personalidad.

A mis amigos de Orense:

- A **Belén** por estar discretamente a mi lado y estar pendiente de mis cosas.
- A **Ester** por tu sosiego, por la paz que me transmites y por la placidez y la quietud con la que me das tu opinión ante mis problemas, siempre adecuada.
- A **Lara** por tu virtud de escuchar y de simplificar las cosas cuando a veces parece imposible.
- A **Nemesio** por tu pericia para hacer de la vida una comedia.
- A **Núria** por tu afán de intentar mantener a todo el grupo unido.

Me reconforta el hecho de saber que después de que hayan pasado los años aún sigo contando con vuestro apoyo y comprensión.

También me gustaría nombrar a **Vure** ya que últimamente está siendo un pilar importante en este período tan complicado.

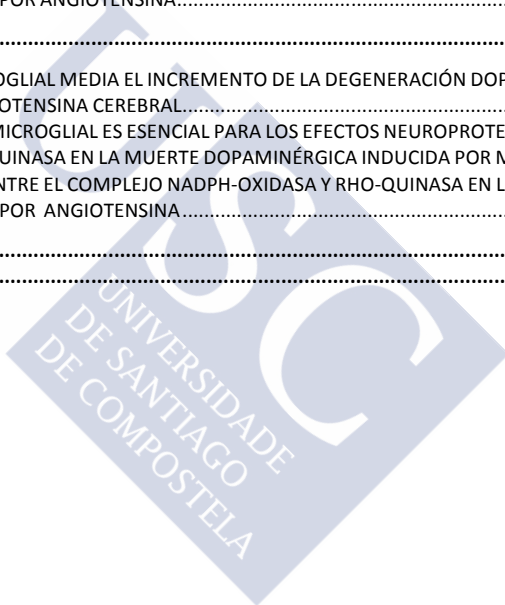
A mis amigas de Lugo:

- A **Goretti** por la felicidad que contagias y por la ternura con la que nos tratas.
- A **Laura** por esa suavidad y cordialidad que demuestras.
- A **Lucía** por esa calma, y por tu equilibrio.
- A **Marijose** por tu preocupación, por tu amabilidad, por las ganas de ayudar y de intentar solucionar todo lo que te piden.
- A **Tare** por acogerme en tu casa, por ser tan complaciente y porque la próxima vez que vuelva a Madrid voy contigo a la “Posada de las ánimas” que sé que lo estás deseando, jajajajajajaja.
- A **Tere** por tu resignación ante el desgaste de tu nombre, jajaja... y por ser siempre tan encantadora.

# ÍNDICE

<b>ANEXO</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON	3
1.1.1 Características clínicas, neuropatología, fisiopatología, etiología y diagnóstico	3
1.1.2 Patogénesis	5
1.1.3 Tratamiento	9
1.1.4 Modelos experimentales	16
1.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	21
1.2.1 Generalidades	21
1.2.2 Receptores de Angiotensina II	23
1.2.3 Sistema Renina-Angiotensina en el Cerebro	24
1.2.4 Sistema Renina-Angiotensina en el sistema nigro-estriatal	25
1.2.5 Sistema Renina-Angiotensina y Enfermedad de Parkinson	26
1.3 PAPEL DE LA MICROGLIA Y LA INFLAMACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	27
1.3.1 Subtipos de microglía activada	30
1.3.2 Mecanismos de polarización microglial	30
1.4 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA	32
1.5 COMPLEJO NADPH-OXIDASA	34
1.6 VÍA RHOA/ROCK	34
1.7 ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y PAPEL DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA, DEL COMPLEJO NADPH-OXIDASA Y DE LA VÍA RHOA/ROCK	38
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL	45
2.2 OBJETIVOS CONCRETOS	45
2.2.1 Justificación de objetivos 1 y 2	45
2.2.2 OBJETIVOS 1 Y 2	46
2.2.3 Justificación de objetivo 3	46
2.2.4 OBJETIVO 3	46
2.2.5 Justificación de objetivos 4 y 5	47
2.2.6 OBJETIVOS 4 y 5	47
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	51
3.1.1 El TNF- $\alpha$ microglial media el incremento de la degeneración dopaminérgica inducido por la angiotensina cerebral	51
3.1.2 La inhibición de la respuesta microglial es esencial para los efectos neuroprotectores de los inhibidores de Rho- quinasa en la muerte dopaminérgica inducida por MPTP	52
3.1.3 Interacción entre el complejo NADPH-oxidasa y Rho-quinasa en la activación microglial inducida por Angiotensina	52
3.2 MODELOS ANIMALES	53
3.3 MODELOS CELULARES	54
3.3.1 Cultivos primarios mesencefálicos	54
3.3.2 Cultivos primarios mesencefálicos carentes de microglía	54
3.3.3 Cultivos primarios enriquecidos en microglía	55
3.3.4 Línea dopaminérgica MES 23.5	55
3.3.5 Línea microglial N9	56
3.4 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	57

3.4.1 Procesado de tejido cerebral.....	57
3.4.2 Determinación de los niveles de TNF- $\alpha$ .....	58
3.4.3 Determinación de la actividad NADPH oxidasa y Rho-quinasa.....	59
3.5 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT) .....	60
3.6 PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR).....	62
3.7 INMUNOCITOQUÍMICA / INMUNOHISTOQUÍMICA .....	63
3.8 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO Y MEDIDA DE LONGITUDES DE NEURITAS.....	64
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	65
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
4.1 EL TNF- $\alpha$ MICROGLIAL MEDIA EL INCREMENTO DE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA INDUCIDO POR LA ANGIOTENSINA CEREBRAL.....	69
4.2 LA INHIBICIÓN MICROGLIAL ES ESENCIAL PARA LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DE LOS INHIBIDORES DE RHO-QUINASA EN LA MUERTE DOPAMINÉRGICA INDUCIDA POR MPTP.....	85
4.3 INTERACCIÓN ENTRE EL COMPLEJO NADPH-OXIDASA Y RHO-QUINASA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL INDUCIDA POR ANGIOTENSINA.....	95
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>115</b>
5.1 EL TNF- $\alpha$ MICROGLIAL MEDIA EL INCREMENTO DE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA INDUCIDO POR LA ANGIOTENSINA CEREBRAL.....	117
5.2 LA INHIBICIÓN MICROGLIAL ES ESENCIAL PARA LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DE LOS INHIBIDORES DE RHO-QUINASA EN LA MUERTE DOPAMINÉRGICA INDUCIDA POR MPTP.....	122
5.3 INTERACCIÓN ENTRE EL COMPLEJO NADPH-OXIDASA Y RHO-QUINASA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL INDUCIDA POR ANGIOTENSINA.....	125
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>





**ANEXO**



## **Mecanismos de activación microglial en degeneración dopaminérgica: papel del eje Angiotensina/AT1/Rho-quinasa**

### **RESUMO**

Existe un Sistema Renina Anxiotensina (SRA) a nivel nigroestriatal, cuxa hiperactivación está implicada no desenvolvemento da enfermidade de Parkinson (EP). Estudos previos demostran que a anxiotensina (AII), vía receptores de AII tipo 1 (AT1), provoca, a nivel microglial, a activación do complexo NADPH-oxidasa e da vía RhoA/ROCK. Ambos mecanismos están implicados na regulación da neuroinflamación, do estrés oxidativo e na progresión da dexeneración dopaminérxica na EP. Na presente tesis doutoral, abórdase o estudo da interrelación entre o complexo NADPH-oxidasa e a vía RhoA/Rock na activación microglial inducida por AII e demoústrase o papel determinante do TNF- $\alpha$  de orixe microglial na morte celular dopaminérxica inducida pola hiperactivación do SRA.

**PALABRAS CHAVE:** anxiotensina, microglía, neuroinflamación, neuroprotección, NADPH-oxidasa, enfermidade de Parkinson, vía RhoA/ROCK.

### **RESUMEN**

Existe un Sistema Renina Angiotensina (SRA) a nivel nigroestriatal, cuya hiperactivación está implicada en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (EP). Estudios previos demuestran que la angiotensina (AII), vía receptores de AII tipo 1 (AT1), provoca, a nivel microglial, la activación del complejo NADPH-oxidasa y de la vía RhoA/ROCK. Ambos mecanismos están implicados en la regulación de la neuroinflamación, del estrés oxidativo y en la progresión de la degeneración dopaminérgica en EP. En la presente tesis doctoral, se aborda el estudio de la interrelación entre el complejo NADPH-oxidasa y la vía RhoA/Rock en la activación microglial inducida por AII y se demuestra el papel determinante del TNF- $\alpha$  de origen microglial en la muerte celular dopaminérgica inducida por hiperactivación de SRA.

**PALABRAS CLAVE:** angiotensina, microglía, neuroinflamación, neuroprotección, NADPH-oxidasa, enfermedad de Parkinson, vía RhoA/ROCK.

### **SUMMARY**

There is a local Renin-Angiotensin system (RAS) in the nigrostriatal dopaminergic system. Hyperactivation of RAS is involved in development of Parkinson's disease (PD). Previous studies have shown that the angiotensin II (AII) plays a major role, via angiotensin type 1 (AT1) receptors, in the activation of the NADPH-oxidase complex and the RhoA/ROCK pathway, which play a major role in neuroinflammation, oxidative stress and progression of dopaminergic degeneration. In the present study, we investigated the crosstalk between NADPH-oxidase and RhoA/ROCK pathway in the angiotensin-induced activation of the microglial response and furthermore, the results show that microglial TNF- $\alpha$  plays a major role in RAS hiperactivation-induced dopaminergic cell death.

**KEYWORDS:** angiotensin, microglia, neuroinflammation, neuroprotection, NADPH-oxidase, Parkinson's disease, RhoA/ROCK pathway.

## Abreviaturas:

- 6-OHDA: 6-hidroxidopamina
- A (1-7): Angiotensina (1-7)
- AADC aminoácido aromático decarboxilasa
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AGT: angiotensinógeno
- AI: Angiotensina I
- AII: Angiotensina II
- AIV: Angiotensina (3-8)
- ARA II: Antagonistas de receptores de AII
- ARN: ácido ribonucleico
- AT1: receptor de angiotensina de tipo 1
- AT2: receptor de angiotensina de tipo 2
- ATP: Adenosín Trifosfato
- ATV: área tegmental ventral
- BCC: bloqueadores de canales de Calcio
- BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés *brain-derived neurotrophic factor*)
- BSA: suero de albúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)
- cADN: ADN complementario
- COMT: catecol-O-metiltransferasa
- Co Q10: coenzima Q10
- COX: citocromo c oxidasa
- D1: receptor de dopamina tipo 1
- D2: receptor de dopamina tipo 2
- DA: Dopamina
- DIV: días *in vitro*
- DMEM: Medio Esencial Mínimo de Dulbecco
- dNTP: deoxinucleótido (del inglés *deoxynucleotide*)
- DPBS: tampón salino-fosfato Dulbecco (del inglés *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*)
- ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina
- EDTA: ácido etilendiaminetetraacético (del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EGTA: ácido etilenglicoltetraacético (del inglés *ethylene glycol tetraacetic acid*)
- EP: Enfermedad de Parkinson
- FBS: suero fetal bovino (del inglés *Fetal Bovine Serum*)
- GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (del inglés *gamma-aminoabutyric acid*)
- GAD: Descarboxilasa del ácido glutámico (del inglés *glutamic acid decarboxylase*)
- GADPH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía (del inglés *Glial cell line-derived neurotrophic factor*)
- GDP: Guanosín Difosfato
- GP: Globo pálido
- Gpe: Globo pálido externo
- Gpi: Globo pálido interno
- GTPasas: guanosinas trifosfatasa

- HRP: peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno
- IECA: inhibidores de la enzima convertidora de AII
- IGF-1: factor de crecimiento insulínico I (del inglés *Insulin-like growth factor I*)
- IL: Interleucina
- iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible (del inglés *inducible Nitric oxide synthase*)
- L-DOPA: Levodopa
- LME: L-leucina-metil-éster
- LPS: lipopolisacárido
- MAO-B: Monoamino oxidasa-B
- MasR: receptor Mas
- MIP: proteína inflamatoria de macrófagos
- MMVL-RT: reverso transcriptasa de virus de leucemia murina (del inglés, *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*)
- MPP+: 1-metil-4-fenilpiridina
- MPTP: 1-metil-4-fenil.1,2,3,6-tetrahidropiridina
- NAC: N-acetilcisteína
- NF-κβ: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- NMDA: receptores N-metil-D-aspartato
- NO: Óxido nítrico
- NOS: Sintasa de óxido nítrico (del inglés *nitric oxide synthase*)
- Nox: NADPH Oxidasas
- NSAIDs: antiinflamatorios no esteroideos
- NST: Núcleo subtalámico
- OH: hidroxilo
- Oxphos: sistema de fosforilación oxidativa
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*)
- PDTC: Pirrolidinditiocarbamato de amonio
- PINK-1: Quinasa 1 p-ten inducida
- PKC/PKN: proteinquinasa
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
- PPAR-γ: Receptor gamma activado por peroxisomas (del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)
- PRR: Receptor de (pro)renina
- RIPA: Ensayo de inmunoprecipitación (del inglés, *Radio Immunoprecipitation Assay*)
- RLU: unidades relativas de luz
- RNS: Especies reactivas del nitrógeno
- ROCK: Rho-quinasa
- ROS: Especies reactivas del oxígeno
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute
- SEM: error estándar de la media
- SN: sustancia negra
- SNC: Sistema nervioso central
- SNpc: Sustancia negra pars compacta
- SNpr: Sustancia negra pars reticulata



## *Anexo*

- SRA: Sistema renina-angiotensina
- SS: sulfasalazina
- ST: estriado
- TH: Tiroxina hidroxilasa
- TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (del inglés *tumor necrosis factor alpha*)
- TNFR1: receptor I de factor de Necrosis Tumoral
- TNFR2: receptor II de factor de Necrosis Tumoral
- UHCL-1: Ubiquitina carboxil-hidroxilasa 1
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *vascular endothelial growth factor*)
- WB: Western blot
- YG: yuxtglomerular



## Publicaciones incluidas en la tesis

**Borrajó A**, Rodríguez-Pérez AI, Díaz-Ruiz C, Guerra MJ, Labandeira-García JL (2014) *Microglial TNF- $\alpha$  mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin*. *Glia*, 62(1):145-57.

**Borrajó A**, Rodríguez-Pérez AI, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-García JL (2014) *Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death*. *Neuropharmacology*, 85:1-8.

Rodríguez-Pérez AI, **Borrajó A**, Rodríguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-García JL (2015) *Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation*. *Glia*, 63(3):466-82.



## **Participación en otras publicaciones durante el período de doctorado**

**Borrajo A**, Rodríguez-Pérez AI, Labandeira-García JL *Reciprocal regulation between IGF-1 and angiotensin-II in the substantia nigra: implications for aging and neurodegeneration*. En preparación.

Rodríguez-Pérez AI, **Borrajo A**, Valenzuela R, Lanciego JL, Labandeira-García JL (2015) *Critical period for dopaminergic neuroprotection by hormonal replacement in menopausal rats*. Neurobiol Aging. 36(2):1194-208.

Labandeira-García JL, Rodríguez-Pérez AI, Villar-Cheda B, **Borrajo A**, Domínguez-Mejide A, Guerra MJ (2014) *Rho Kinase and Dopaminergic Degeneration: A Promising Therapeutic Target for Parkinson's Disease*. Neuroscientist. Review.

Labandeira-García JL, Garrido-Gil P, Rodríguez-Pallares J, Valenzuela R, **Borrajo A**, Rodríguez-Pérez AI (2014) *Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability*. Front Neuroanat. 8; 8: 67. Review.

De La Fuente M, **Borrajo A**, Bermúdez J, Lores M, Alonso J, López M, Santalla M, De Ron AM, Zapata C, Alvarez G (2011) *2-DE-based proteomic analysis of common bean (Phaseolus vulgaris L.) seeds*. J Proteomics. 74(2):262-7.



# **INTRODUCCIÓN**



## 1.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON

### 1.1.1 Características clínicas, neuropatología, fisiopatología, etiología y diagnóstico.

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo desorden neurodegenerativo asociado a la edad y de origen desconocido más común en el mundo y que afecta a 6,3 millones de personas en todo el planeta. Se produce mayoritariamente en edad avanzada y en un 10% de los casos descubiertos es debido a factores genéticos (Qian et al., 2010). Se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* (SN) *pars compacta* y por la presencia de inclusiones proteicas citoplasmáticas intraneuronales (cuerpos de Lewy) en las neuronas supervivientes así como en otras regiones centrales y periféricas del sistema nervioso central (SNC). Los cuerpos de Lewy están constituidos por neurofilamentos que se acumulan por un defecto de fosforilación. Están formados fundamentalmente por  $\alpha$ -sinucleína, una proteína presináptica, cuya función exacta se desconoce, y algunas otras proteínas como la ubiquitina, gelsolina y quinasas (Johnson and Bobrovskaya, 2014). Su acumulación en las neuronas de la corteza cerebral y de otros núcleos subcorticales ocasiona la llamada demencia de cuerpos de Lewy (Spillantini et al., 1997).

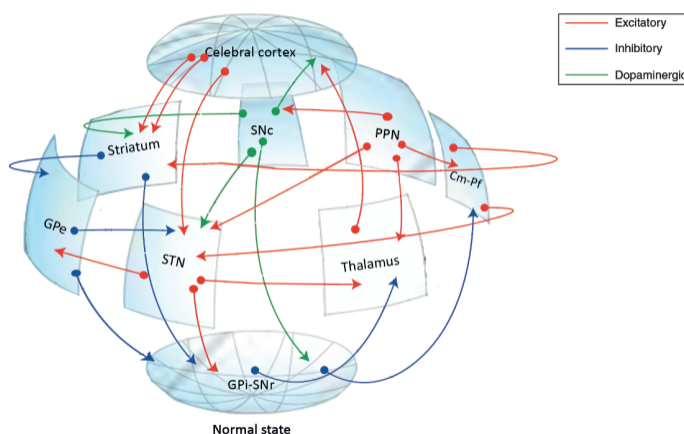
La degeneración de neuronas dopaminérgicas produce una disminución de los niveles de dopamina en el estriado lo que causa una pérdida de la regulación del circuito motor de los ganglios basales. Los ganglios basales son acumulaciones de cuerpos de células nerviosas de localización subcortical que se hallan cerca de la base del cerebro. Incluyen el estriado (caudado y putamen), núcleo subtalámico (NST), globo pálido externo (Gpe) e interno (Gpi), núcleo ventral del tálamo y las SN *pars compacta* (SNpc) y SN *pars reticulada* (SNpr) (Obeso and Lanciego, 2011; Obeso et al., 2008). Estos núcleos están interconectados con la corteza cerebral, el tálamo y el tronco cerebral y esta red córtico-subcortical que forman es la responsable del control motor. En este circuito motor las áreas corticales motoras inervan el putamen. En éste se originan dos vías principales llamadas: a) directa y b) indirecta.

En la vía directa, las neuronas estriales gabaérgicas envían proyecciones inhibitorias sobre las células del complejo SNR-GPi por medio de una conexión monosináptica. La vía directa, por lo tanto, da como resultado la excitación de la corteza motora a través del tálamo. La vía indirecta también se inicia a partir de las neuronas gabaérgicas en el estriado que inervan la

## Introducción

porción externa del Gpe que conecta con el NST que a su vez proyecta al Gpi y a la SNpr. El resultado final es la inhibición del tálamo y, por lo tanto, disminuye la estimulación de la corteza motora por el tálamo. Las vías directas e indirectas son, por tanto, antagonistas en sus funciones. La vía directa se ve activada, por la inervación dopaminérgica procedente de las neuronas de la SNpc, en el putamen a través de receptores tipo D1, mientras que las neuronas de la vía indirecta poseen receptores D2 que inhiben su descarga. De esta manera, la vía directa favorece la realización de movimientos voluntarios mientras que la indirecta evita los involuntarios (DeLong and Wichmann, 2007; Obeso et al., 2002) (**Figura 1**).

Recientemente se ha descrito una vía alternativa “hiperdirecta” que transmite poderosos efectos excitatorios, desde las zonas corticales motoras al globo pálido pasando por el NST y sin pasar por el estriado, con muy corto tiempo de conducción (Nambu et al., 2002).



**Figura 1. Resumen de las principales conexiones del " circuito motor " de los ganglios basales. Modificado de Obeso y Lanciego 2011.**

La degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc encargadas del aporte de dopamina al putamen provoca la pérdida de la regulación de los movimientos motores característica de la EP.

Los síntomas principales de EP son temblor, bradicinesia, rigidez y alteración de reflejos posturales y son debidos a la deficiencia de dopamina. Otros síntomas son trastornos del lenguaje, alteraciones autonómicas (hipotensión ortostática, impotencia, estreñimiento,

seborrea y alteraciones de la regulación térmica), trastornos del sueño, depresión y demencia (Lewis et al., 2003).

La **etiología** de EP está asociada tanto a factores genéticos como ambientales. El número de casos en los que la enfermedad es debida únicamente a una mutación genética es bajo, siendo sólo la décima parte de los casos diagnosticados debidos a factores genéticos (Qian et al., 2010). Hasta el momento se han identificado 13 *loci* cuyo producto génico se ha relacionado con la aparición de la EP. De entre estos, se ha destacado la importancia de los genes que codifican para  $\alpha$ -sinucleína, parkina, PINK1, DJ-1 y LRRK2 (Thomas and Beal, 2011). El desarrollo de la EP familiar también se atribuye a la aparición de mutaciones en otros genes, entre los que destacan, la ubiquitina carboxil-hidroxilasa-1 (UHCL-1), relacionada con el sistema ubiquitín-proteosoma.

En los casos en los que la EP es idiopática se cree que influye tanto la predisposición genética como distintos factores ambientales. Así, se ha relacionado un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad con la exposición a pesticidas y herbicidas; a patógenos tales como virus o bacterias; a metales pesados como el hierro y el manganeso; o a determinados solventes (Dick, 2006; Klawans et al., 1982; Kochen et al., 2003; Liu et al., 2003; Singh et al., 2006; Uversky, 2007) mientras que cafeína y nicotina parecen proteger de ésta (Soto-Otero et al., 2002; Yuan et al., 2007).

Por el momento, se desconocen biomarcadores definitivos para el diagnóstico de EP pero serían imprescindibles por dos razones básicas: (1) para intervenir en el comienzo de la enfermedad y (2) para monitorizar el progreso de intervenciones terapéuticas que deben ralentizar o parar el curso de este desorden (Miller and O'Callaghan, 2014).

### **1.1.2 Patogénesis.**

Una de las características fundamentales de la enfermedad es la pérdida celular en la SNpc. Dependiendo del estado de muerte neuronal, esta región del cerebro puede perder entre el 50-70 % de sus neuronas comparada con la misma región en individuos control (Braak et al., 2004).

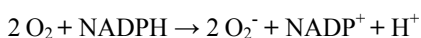
Los procesos moleculares que suceden en los pacientes afectados están interrelacionados por el propio metabolismo celular, de forma que en los casos idiopáticos es muy difícil determinar si uno de ellos es la causa originaria de la enfermedad o la consecuencia y manifestación de otros procesos (Keane et al., 2011). Además, el hecho de que la EP afecte



principalmente a la población mayor y que algunos de los mecanismos patogénicos que se dan en los pacientes afectados se observen en individuos no afectados de avanzada edad complica aún más la interpretación de éstos (Van Den Eeden et al., 2003). Datos obtenidos en numerosos estudios demuestran que la degeneración de neuronas dopaminérgicas no resulta de la acción de un único factor deletéreo, sino de la convergencia de múltiples factores patogénicos. Dichos factores pueden tener su origen en el interior de las propias neuronas dopaminérgicas, o fuera de éstas, por ejemplo en la población glial (Vila et al., 2001). Se ha demostrado que afectan a la degeneración dopaminérgica el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la carencia de factores neurotróficos, la neuroinflamación y la excitotoxicidad (Hirsch et al., 2013).

Asimismo, las investigaciones realizadas en casos genéticos de la EP, han puesto de manifiesto la gran importancia que en el inicio y progresión de la degeneración dopaminérgica tienen: la agregación del exceso de proteínas con respecto a los mecanismos de muerte neuronal, desajustes en los sistemas de degradación proteica, y la acumulación de proteínas no deseadas (Przedborski and Ischiropoulos, 2005).

**Estrés oxidativo.** Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *reactive oxygen species*) son moléculas derivadas del metabolismo del oxígeno altamente reactivas debido a la presencia de electrones de valencia desapareada, lo que hace que actúen como radicales libres que interaccionan y alteran diversos componentes celulares y tienen un importante papel en la señalización celular. Las células eucariotas han desarrollado mecanismos para protegerse y reparar los daños causados por estas especies reactivas (Halliwell, 1992). Cuando la generación de ROS excede la capacidad reparativa de la célula ésta sufre muerte necrótica o apoptótica. A nivel celular, las principales fuentes de ROS son la cadena de respiración mitocondrial y el complejo NADPH-oxidasa. La NADPH-oxidasa cataliza la transferencia de un electrón desde el complejo NADPH hacia el  $O_2$  con la formación de radical superóxido ( $O_2^-$ ). El  $O_2^-$  generado sirve como material de partida para la producción de una amplia gama de reactivos oxidantes, incluyendo peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y ácido hipocloroso. Estos oxidantes son utilizados para destruir a microorganismos invasores, pero también provocan "daños colaterales" a los tejidos cercanos, por lo que su producción debe estar estrictamente regulada. La siguiente reacción química es la correspondiente a la explicación precedente:



(Babior, 1999, 2004; Rodríguez-Pallares et al., 2007).

**Disfunción mitocondrial.** La mitocondria es la principal productora de ROS en la célula, y gran parte de ellas están generadas por los complejos de la cadena respiratoria I y III, consecuencia del flujo de electrones entre ambos complejos (Cordero et al., 2011). Debido a que algunas de estas especies reactivas no atraviesan fácilmente la membrana interna de la mitocondria, estos orgánulos son especialmente vulnerables al estrés oxidativo. Un elemento de vital importancia en la cadena respiratoria mitocondrial es la coenzima Q10 (Co Q10), cuya misión principal es el transporte de electrones de los complejos I y II al III, además de regular el acoplamiento de proteínas, el poro de transición mitocondrial y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Es, además, un importante antioxidante de membrana (Turunen et al., 2004) por lo que los niveles Co Q10 se han propuesto como marcador de disfunción mitocondrial (Haas et al., 2008). Además, estudios previos ponen de manifiesto que una deficiencia de esta enzima induce en la célula una bajada de la actividad de los complejos II, III y IV, una reducción en la expresión de proteínas mitocondriales involucradas en el sistema de fosforilación oxidativa (Oxphos), una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, un incremento en la producción de ROS, una activación en el poro de transición mitocondrial, una activación de la degradación de mitocondrias disfuncionales mediante un proceso autofágico conocido como mitofagia y una reducción en el rango de crecimiento celular (Quinzii et al., 2008; Rodríguez-Hernández et al., 2009).

La proteína quinasa Pink1 ha mostrado tener propiedades neuroprotectoras y se ha localizado en la mitocondria, mientras que mutaciones que afectan al gen que codifica para esta proteína, provocan una forma recesiva de la EP.

**Carencia de factores neurotróficos.** Los factores neurotróficos son proteínas específicas del sistema nervioso que desempeñan un papel esencial en la supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal durante el desarrollo del SNC y periférico. Estas moléculas estimulan el crecimiento axonal e influyen en las conexiones con el tejido diana para el establecimiento definitivo de las conexiones sinápticas (Lynch et al., 2007). Además de promover la diferenciación y crecimiento de las neuronas durante el desarrollo y su supervivencia y mantenimiento en el adulto, existen evidencias que sugieren que algunos sistemas de proteínas, como las neurotrofinas, desempeñan un papel esencial en la protección neuronal del sistema nervioso, modulando la plasticidad neuronal necesaria durante el envejecimiento o

bajo condiciones traumáticas y degenerativas (Gómez-Palacio Schjetnan and Escobar-Rodríguez, 2007; Hünnerkopf et al., 2007).

Estudios en el líquido cefalorraquídeo y regiones de la vía nigroestriatal muestran que los niveles de factores neurotróficos están alterados en pacientes con EP diagnosticada en comparación con individuos de la misma edad no afectados (Mogi et al., 1999a; Nagatsu et al., 2000).

**Neuroinflamación.** La inflamación es una respuesta tisular a un daño celular. Las células de la microglía son las responsables de la respuesta inmune en el cerebro. Estas células son muy sensibles a cualquier cambio patológico que ocurra en el cerebro. En un daño las neuronas lesionadas y los astrocitos provocan la liberación de adenosín trifosfato (ATP, del inglés *adenosine triphosphate*) y la microglía responde con un aumento en la secreción de factores neurotróficos. Pero también provocan la secreción de citoquinas proinflamatorias y la activación de la sintasa de óxido nítrico, del complejo NADPH-oxidasas y de la ciclooxigenasa, que provocan daños en otras células y la progresión de la enfermedad de un modo autoamplificado (Liu, 2006; Liu et al., 2003). La microglía activada según numerosos estudios, juega un papel importante en el desarrollo de gliosis en los cerebros postmortem de pacientes con EP (Langston et al., 1999) en los que además se han observado elevados niveles de citoquinas, así como la reacción microglial en etapas tempranas de degeneración neuronal en diversos modelos animales de neurodegeneración (Herrera et al., 2000; Muñoz et al., 2005; Ogata et al., 1997; Rodríguez-Pallares et al., 2007). La microglía activada produce grandes cantidades de radicales superóxido, y es la fuente principal de estrés oxidativo responsable de la muerte de las células dopaminérgicas en la EP (Jenner, 2003; Koutsilieri et al., 2002).

La demostración *in vivo* de la correlación existente entre la activación microglial y la correspondiente pérdida de terminales dopaminérgicas en la vía nigroestriatal afectada en la EP temprana fue estudiada por Ouchi en 2005. Esta correlación apoya la hipótesis de que la respuesta neuroinflamatoria mediada por la microglía contribuye significativamente al proceso degenerativo y sugiere la importancia de la intervención terapéutica temprana con fármacos neuroprotectores (Ouchi et al., 2005).

**Excitotoxicidad:** es el mecanismo que promueve la muerte celular mediante la sobreactivación, por una producción excesiva de neurotransmisores excitadores, de los receptores glutamatérgicos o de cualquiera de sus análogos. El efecto excitador del glutamato se ejerce a través de la activación de distintos receptores de membrana (Molinuevo et al.,

2005). Esto provoca la entrada excesiva de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a la célula, que es secuestrado por la mitocondria (Lorigados et al., 2013). Ello produce un incremento del calcio mitocondrial, que provoca la disfunción metabólica, la producción de radicales libres, la activación de proteasas, fosfolipasas, la óxido nítrico sintasa y endonucleasas, y la inhibición de la síntesis de proteínas (Haglid et al., 1994).

**Alteraciones del sistema proteolítico.** Hay evidencias que sugieren que fallos del sistema ubiquitina-proteosoma y en la formación de proteínas mal plegadas están implicados en la patogénesis molecular de ambas formas de la EP, familiar y esporádica (Gu et al., 2010a; Gu et al., 2010b; Moore et al., 2005). De hecho, se han observado déficits tanto funcionales como estructurales, del proteosoma en la SNpc de pacientes con EP (McNaught et al., 2002; McNaught and Olanow, 2003; St P McNaught et al., 2003). Asimismo, se han hecho estudios en ratas expuestas a inhibidores sintéticos del proteosoma y concluyen que éstas reproducen las principales características de la EP (McNaught et al., 2004). Esto sugiere que quizás una disfunción proteosomal puede ser el punto final común que precipita la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la EP (Moore et al., 2005). La acumulación y agregación de proteínas potencialmente citotóxicas, incluyendo la  $\alpha$ -sinucleína, en los cuerpos de Lewy podría generar el desplegamiento generalizado de proteínas y el consiguiente estrés proteolítico, lo cual desembocaría finalmente en el fallo de la función del sistema ubiquitina-proteosoma.

### **1.1.3 Tratamiento.**

El tratamiento ideal de una enfermedad neurodegenerativa es aquel que revierta, al menos, ralentice o detenga la progresión de la enfermedad. A pesar del interés que genera la EP y los esfuerzos investigadores, hasta el momento ningún tratamiento ha demostrado ser efectivo en la capacidad de interferir con los mecanismos fisiopatológicos que originan la enfermedad. Fundamentalmente el tratamiento es farmacológico y está enfocado a suplir el déficit de dopamina y/o mimetizar sus efectos (Fargel et al., 2007; Wu and Frucht, 2005).

**Tratamiento no farmacológico.** El abordaje no farmacológico del paciente con EP, debe incluir la educación-información del mismo, medidas de soporte, con valoración de las necesidades emocionales, puesta en contacto con grupos de apoyo, consejos profesionales sobre todo de médicos y psiquiatras, así como consejos legales, financieros y laborales.

El ejercicio físico debe ser aeróbico, de bajo consumo energético, y en cuanto a la nutrición es aconsejable una dieta equilibrada incluyendo todo tipo de comida, rica en fibra y fluidos para evitar el estreñimiento, con restricción de proteínas sólo en estadios avanzados.

**Tratamiento farmacológico.** Como ya se ha mencionado, el tratamiento es habitualmente farmacológico, y aunque todavía existen controversias con respecto a cuándo y cómo iniciar el mismo, sigue siendo la **levodopa (L-dopa)** el tratamiento más eficaz, especialmente en cuanto a la bradicinesia y la rigidez (Miyasaki et al., 2002). La L-dopa es el precursor de la dopamina que, a diferencia de ésta, consigue atravesar la barrera hematoencefálica. Para transformarse en dopamina requiere de la acción de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AADC). Ésta se encuentra en numerosos tejidos periféricos, es por ello, que actualmente la L-dopa, se usa en combinación con **carbidopa** o **benserazida**. Ambas impiden la conversión periférica de L-dopa a dopamina, evitando así, los efectos adversos que tendrían lugar debido a dicha descaboxilación tales como náuseas, vómitos, cefaleas, taquicardia, arritmias e hipertensión y aumenta la biodisponibilidad de L-dopa en el cerebro (Chaná, 2009).

En general, se acepta iniciar la terapia antiparkinsoniana cuando los síntomas interfieren en la realización de las tareas habituales, teniendo en cuenta la edad, situación laboral y tipo de trabajo desarrollado por el paciente. Habitualmente, en pacientes mayores de 70 años, el tratamiento se inicia directamente con L-dopa. La mayoría de los neurólogos sugieren que, salvo contraindicaciones, por debajo de esta edad, se inicie tratamiento con **agonistas dopaminérgicos**, (Jankovic and Tolosa, 2007) solos o con bajas dosis de L-dopa. Estos fármacos actúan estimulando directamente los receptores postsinápticos, obteniendo un aceptable efecto sintomático y retrasando la aparición de complicaciones derivadas del uso de L-dopa (Frucht and Greene, 2002; Pondal et al., 1996). El primer agonista utilizado fue la bromocriptina en 1970 y posteriormente han ido surgiendo otros como la pergolida, cabergolina, pramipexol y ropinirol que son derivados no ergóticos, por lo que evitan la aparición de ciertos efectos secundarios, aunque se han relacionado con episodios de sueño. El primer agonista dopaminérgico sintetizado, la apomorfina, puede administrarse por vía subcutánea como pauta de rescate en los fallos de respuesta. Una gran mayoría de los pacientes tratados con apomorfina desarrolla efectos adversos en forma de discinesias coreiformes y distonías, así como fluctuaciones motoras. Puede provocar también sedación, pesadillas durante el sueño y problemas neuropsiquiátricos: alucinaciones confusión, psicosis,

manía e hipersexualidad. No mejora algunos síntomas como la congelación, la inestabilidad postural, la disfunción autonómica y la demencia. No detiene la progresión de la enfermedad y probablemente los metabolitos oxidativos derivados de su catabolismo podrían acelerar la EP. Las reacciones adversas más frecuentes son náuseas, vómitos, hipotensión ortostática, psicosis y discinesias.

Otros de los fármacos utilizados son los **inhibidores de la monoamino oxidasa B** (iMAO-B). Estos inhiben de forma irreversible la acción de la MAO-B, enzima encargado de metabolizar la dopamina. De esta manera, se ve aumentada la biodisponibilidad de ésta a nivel sináptico. Usados en combinación con la L-dopa, potencian sus efectos antiparkinsonianos. Uno de los más utilizados es la selegilina.

Más recientemente han aparecido los **inhibidores de la Catecol-O-metiltransferasa** (COMT), como por ejemplo, la **entacapona**, que reducen la descarboxilación periférica de la L-dopa, y por tanto, aumentan su biodisponibilidad a nivel cerebral.

Por otro lado, están los **fármacos anticolinérgicos** que resultan útiles en pacientes con síntomas leves, especialmente cuando predomina el temblor y la rigidez.

La eficacia limitada de estos tratamientos farmacológicos así como sus efectos secundarios hacen que se investiguen continuamente nuevos tratamientos alternativos. Entre ellos, cabe destacar a los **agentes neuroprotectores** que buscan preservar las células y circuitos neuronales con el fin de retrasar, ralentizar o incluso detener la aparición y progresión de la EP una vez iniciado el tratamiento (Sanchez et al., 2002a). Se están probando distintas moléculas, y aunque ninguna de ellas se ha mostrado efectiva interrumpiendo la progresión de la enfermedad, muchas han mostrado mejorías clínicas significativas. Estos fármacos tienen como diana los mecanismos patogénicos de la EP descritos anteriormente (Fahn, 1992; Ravina et al., 2003).

Se ha visto que el tratamiento con distintas moléculas antioxidantes disminuyen el **estrés oxidativo** generado en las neuronas dopaminérgicas (Singh et al., 2007). **Las vitaminas A, C y E** son antioxidantes, pudiendo reducir los niveles de peroxidación lipídica (Fahn, 1992). Los iMAO, además de incrementar la disponibilidad de dopamina en el SN, han mostrado propiedades neuroprotectoras relacionadas con la reducción del estrés oxidativo (Chung et al., 2015). El **selenio** también posee actividad neuroprotectora por su relación con el metabolismo del glutatión (Schweizer et al., 2004; Yamagata et al., 2008).

Nuestro grupo lleva años trabajando en una estrategia neurotropectora altamente prometedora: la inhibición del Sistema Renina Angiotensina (SRA).

Además de las ya mencionadas, nuevos estudios ponen de manifiesto las características neuroprotectoras de otras moléculas capaces de reducir el estrés oxidativo, como la **N-acetil-cisteína** (Muñoz et al., 2004), **inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina II, iECAs** (Lopez-Real et al., 2005) o la **nicotina** (Soto-Otero et al., 2002). **Los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II)**, son un grupo de medicamentos que modulan al sistema renina angiotensina aldosterona (Kirk, 1999). El bloqueo de los receptores AT1 de manera directa causa vasodilatación, reduce la secreción de la vasopresina y reduce la producción y secreción de aldosterona, entre otras acciones (Steinberg, 1998). Los ARA II no bloquean la degradación de bradiquinina ni aumentan la síntesis de prostaglandinas (Kirk, 1999; Steinberg, 1998). El losartán fue el primer ARA II comercializado en España, siendo el fármaco del grupo del que se dispone mayor experiencia clínica (de Farmacéuticos, 2006); posteriormente se han comercializado otros sartanes como: candesartán, eprosartán, irbesartán, telmisartán y valsartán (de Farmacéuticos, 2006).

Moléculas neuroprotectoras relacionadas con la **función mitocondrial** son la **Co Q10** y la **creatina**. La Co Q10, también denominada ubiquinona, es un componente de la cadena respiratoria mitocondrial implicado en la generación de ATP con propiedades antioxidantes. La creatina es una molécula que es capaz de almacenar energía química y permite la formación de ATP en la mitocondria (Bonuccelli and Del Dotto, 2006).

Para reducir la **excitotoxicidad** que ocurre en pacientes de EP se han probado **inhibidores de la liberación de glutamato** como el riluzol (Rodriguez et al., 1998), **antagonistas de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato)** (Bonuccelli and Del Dotto, 2006) y **bloqueantes de canales de calcio** (Pivovarov and Andrews, 2010).

Existen fármacos con propiedades neuroprotectoras relacionadas con la expresión *in situ* de factores neurotróficos. La carencia de **factores neurotróficos** se puede compensar mediante el uso de neuropéptidos como el Factor Neurotrófico Derivado de línea celular Glial (**GDNF**, del inglés *Glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Evans and Barker, 2008; Yasuhara et al., 2007) favoreciendo la expresión de estos factores por parte de células presentes en el propio sistema nervioso (Sanchez et al., 2002b). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el ejercicio físico también favorece la supervivencia celular



dopaminérgica al inducir la expresión y aumentar la disponibilidad de diversos factores neurotróficos dentro y fuera del sistema nervioso (Villar-Cheda et al., 2008).

Debido al papel que la **inflamación** tiene en la patogénesis de la EP, el uso de agentes que reduzcan la reacción microglial o moléculas anti-inflamatorias como **inhibidores de la ciclooxigenasa** (aspirina, meloxicam) o **anti-inflamatorios no esteroideos** (ibuprofeno, naproxeno) han mostrado tener efectos beneficiosos (Bonuccelli and Del Dotto, 2006; Gao et al., 2011; Wilms et al., 2007).

Para evitar los **daños producidos por alteraciones en el procesado de las proteínas** se ha propuesto el uso de **inhibidores de la función del proteosoma** (Yamamoto et al., 2007). Por otro lado, se sabe que el hierro acelera la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína de modo que **agentes quelantes del hierro** (desferoxamina, agente V-28) también resultan beneficiosos al reducir la formación de agregados proteicos (Singh et al., 2006).

También se están desarrollando “**vacunas**” que ayuden a prevenir la aparición de la enfermedad. El uso de sustancias capaces de inducir la activación de linfocitos T capaces de liberar citoquinas antiinflamatorias y favorecer la expresión de GDNF en el cerebro o inmunizados con agregados de  $\alpha$ -sinucleína se han mostrado efectivos en modelos experimentales de la EP (Benner et al., 2004; Masliah et al., 2005).

**Tratamiento quirúrgico.** En pacientes en fases tardías de la enfermedad, en los que las complicaciones debidas al uso de la L-dopa son inhabilitantes, se suelen emplear estrategias neuroquirúrgicas basadas en el modelo de funcionamiento de los ganglios basales y los resultados positivos de ciertas **ablaciones quirúrgicas (Walter and Vitek, 2004)**. Se ha observado que la ablación quirúrgica del GP y del tálamo provoca una mejoría en los síntomas motores de la EP. Estas observaciones encajan con modelos en los que la hiperactividad de núcleos propios de la vía indirecta de los ganglios basales (globo pálido, GP, y NST) provoca un descenso en el tono talamocortical y la estimulación del córtex motor. **La estimulación cerebral profunda** utiliza un electrodo que es implantado estereotáxicamente en el núcleo elegido para su estimulación eléctrica (Benabid, 2003). Se cree que actúa de modo similar a las ablaciones quirúrgicas, pero tiene las ventajas de que es ajustable, reversible y con menores efectos secundarios. En este caso tampoco están exentos de complicaciones debidas a la cirugía o derivadas del mal funcionamiento de los equipos empleados (Singh et al., 2007). NST, GPi o el núcleo talámico ventral intermedio son algunos de los núcleos que mejores resultados ofrecen a estas aproximaciones (Hodaie et al., 2007;



Lang, 2000). Debido a las posibles complicaciones inherentes a la técnica y a la variabilidad de la respuesta en distintos individuos y grados de afectación, el tratamiento quirúrgico no está recomendado para todos los pacientes.

**Terapia génica.** El desarrollo de la medicina molecular ha permitido la utilización de estrategias de terapia génica para el posible tratamiento de la EP. Una de las principales ventajas de esta aproximación es que permite la manipulación de la liberación del producto génico en localizaciones concretas, en las cantidades necesarias y de forma regulada, mediante el uso de vectores víricos (adenovirus y lentivirus, principalmente) o no víricos (lisosomas) (Singh et al., 2007).

En la actualidad, los ensayos clínicos de terapia génica se basan fundamentalmente en tres estrategias terapéuticas distintas. En primer lugar, aumentando los niveles de dopamina, terapia dirigida a aumentar la actividad de los genes implicados en la síntesis de dopamina (Hodaie et al., 2007). En segundo lugar, existen las terapias basadas en la expresión del factor neurotrófico GDNF en la SN y el estriado para la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas y el mantenimiento de la vía nigroestriatal (D'anglemont de tassigny et al., 2015). En tercer lugar, manipulaciones de la función del circuito de los ganglios basales mediante el uso de genes como el de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, de sus siglas en inglés *glutamic acid decarboxylase*). Cuando es transferido al NST sintetiza el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico GABA, (del inglés *gamma-aminoabutyric acid*) y, de esta forma, inhibe la excitación patológica que sucede en este núcleo (Ishiwari et al., 2004).

Algunos trabajos también apuntan hacia los genes defectivos en la EP de tipo familiar como posible diana de actuación de la terapia génica (Jiménez-Jiménez and Molina, 1997). A pesar del enorme potencial de esta aproximación, hasta ahora, los resultados distan mucho de ser los esperados, con la aparición de efectos secundarios no deseados en ciertos tratamientos y con reservas en cuanto al uso de vectores virales para su uso clínico (Thomas et al., 2003).

**Terapia celular:** basada en la idea de que la implantación de células con fenotipo neuronal productoras de dopamina en el estriado denervado podría ser capaz de sustituir a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas que se han perdido. En sentido estricto, la **regeneración neuronal** se basa en el uso de células para volver a formar los circuitos neuronales dañados con restauración de la capacidad neuronal (Hedlund and Perlmann, 2009).

Los trasplantes celulares pueden actuar de distintos modos para lograr la recuperación del paciente: mediante la liberación de dopamina directamente por parte de las células

transplantadas, por medio de la liberación de factores neurotróficos que favorezcan la supervivencia y la funcionalidad de las neuronas situadas en la SNpc, o por la acción local que permita la reinervación y el rebrote de terminales estriales para la liberación de dopamina (Rodríguez-Pallares et al., 2012a).

Según el origen y la naturaleza de las células utilizadas se dividen en varios grupos:

La tecnología de **encapsulación celular** con polímeros biocompatibles permite el uso de diversos tipos celulares para su trasplante. Células productoras de dopamina pueden ser encapsuladas e implantadas para incrementar el aporte de este neurotransmisor en el estriado (Yasuhara et al., 2007).

Los **aloimplantes** de tejido de otro individuo, donde destacan los estudios animales y clínicos basados en **trasplante de células fetales** procedentes de la parte ventral del mesencéfalo (Lindvall and Björklund, 2004). El uso de este tejido en terapia para la EP se fundamenta en dos hipótesis, (1) los principales síntomas de la EP son debidos a la pérdida de inervación dopaminérgica de la vía mesoestriatal y (2) las neuronas dopaminérgicas que pueden llegar a diferenciarse del tejido implantado permitirían el aporte de dopamina al estriado (Gupta and Dawson, 2007). El balance entre riesgos y beneficios ha conducido al replanteamiento del uso de tejido fetal para la terapia de la EP. Se han señalado distintos aspectos que habrá que tener en cuenta antes de seguir con estos ensayos clínicos (Lindvall and Björklund, 2004), como son:

- Es necesario que la mejora clínica lograda con este tratamiento sea aún mayor.
- La variabilidad en la respuesta al trasplante debe ser reducida, para lo cual habrá que tener en cuenta diversos factores.
- Se requiere el desarrollo de técnicas para la generación de células dopaminérgicas en cantidad suficiente para hacer viable clínicamente su uso en trasplantes.
- El mecanismo responsable de las disquinesias debe de ser descubierto para poder ser evitado en futuros trasplantes El uso de tejido mesencefálico fetal para trasplante conlleva serias dificultades técnicas (Dunnett et al., 2001). Otras alternativas al uso de embriones humanos es el uso de material procedente de especies distintas por medio de **xenotrasplantes**. El uso de tejido porcino fetal ya ha sido probado en pacientes de EP con resultados problemáticos (Fink et al., 1999) y tiene graves inconvenientes como el rechazo inmunológico y el riesgo de infección por parte de retrovirus de origen porcino.

### 1.1.4 Modelos experimentales.

La EP es propia del ser humano y no se conocen otras especies que presenten esa patología. Disponer de modelos experimentales de la EP es fundamental para poder seguir avanzando en la investigación. Un modelo experimental debería reproducir la mayoría, sino todas las características de la enfermedad en humanos. Los modelos nos permiten no solo investigar acerca de la etiología de la enfermedad, sino que también facilitan el desarrollo de nuevos agentes neuroprotectores o estrategias terapéuticas (Duty and Jenner, 2011; und Halbach, 2005).

Existen dos tipos de modelos experimentales, modelos *in vitro* y modelos *in vivo*.

- Los modelos *in vitro* proporcionan una importante herramienta para investigar los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en los procesos tóxicos. Son muy útiles para llevar a cabo estudios que son difíciles de realizar en los modelos *in vivo*. La principal limitación es que deben representar lo más exactamente posible el sistema *in vivo* que es objeto de estudio (Zeng et al., 2006).
- El uso de modelos animales permite no sólo realizar investigación básica sino también investigar diferentes estrategias terapéuticas como requisito previo a ser testadas en pacientes. Un modelo animal de la EP adecuado debería reproducir las características principales de la misma, tales como, lesión selectiva de neuronas dopaminérgicas que evolucione con el tiempo, depleción de dopamina en el estriado y presencia de los cuerpos de Lewy. Asimismo, desde el punto de vista del comportamiento, lo idóneo sería que presentase bradicinesia, rigidez y temblor (Schober, 2004).

Generalmente los modelos experimentales *in vivo* de la EP se basan en el uso de una única toxina o un único gen, diferenciando así modelos basados en el uso de toxinas y modelos genéticos (Meredith et al., 2008; und Halbach, 2005).

#### **Parkinsonismo inducido por neurotoxinas.**

Entre las toxinas más usadas que inducen la degeneración de neuronas dopaminérgicas destacan la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-terahidropiridina/1-metil-4-fenil-piridina (MPTP/MPP+), reserpina, paracuat y rotenona.

**6-hidroxidopamina (6-OHDA):** es la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores. Cuando es administrada por vía sistémica destruye las neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos pero carece de acción tóxica a nivel del SNC. Sin embargo, la inyección intracerebral de 6-OHDA produce una

lesión selectiva de neuronas catecolaminérgicas, se cree que por un efecto combinado de ROS y quinonas (Betarbet et al., 2002; Blandini et al., 2008). Presenta algunas similitudes estructurales con la dopamina y la norepinefrina, teniendo así alta afinidad por los transportadores catecolaminérgicos, transportadores de dopamina y transportadores de norepinefrina. Ungersted, en 1968, describió, por primera vez, que la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el haz nigroestriado inducía una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de SN.

Aunque existen estudios que demuestran que la 6-OHDA posee una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial, la muerte neuronal dopaminérgica inducida por 6-OHDA está ligada fundamentalmente a la formación de  $H_2O_2$ , radicales libres tipo hidroxilo (OH) y quinonas que se producen en su metabolización. Así, sustancias antioxidantes como vitamina E ó N-acetil-cisteína, iMAOs y quelantes de hierro como desferoxamina protegen a las neuronas dopaminérgicas de la acción neurotóxica de la 6-OHDA (Blum et al., 2000).

La inyección de 6-OHDA en el haz nigroestriado, induce una degeneración neuronal que afecta por igual a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc que proyectan al estriado y a las del área tegmental ventral (ATV) que forman parte del sistema dopaminérgico mesolímbico. Produce, además, alteraciones neuroquímicas en el estriado que se caracterizan por un descenso muy importante de los niveles de dopamina, serotonina, encefalina y sustancia P, mientras que los niveles estriatales de neurotensina aumentan. Desde el punto de vista histológico, en general, la lesión de SN inducida por 6-OHDA es más extensa que la que se manifiesta en los pacientes parkinsonianos en los que las neuronas del ATV están parcialmente respetadas. Por ello, algunos autores han propuesto utilizar como modelo de EP la inyección de 6-OHDA directamente en la SNpc evitando, de esta manera, la afectación de las neuronas dopaminérgicas del área (Deumens et al., 2002).

Desde el punto de vista conductual, los animales con lesión unilateral de la SN, inducida por inyección directa en el haz nigroestriado o en la SN, presentan inmediatamente después de la cirugía, y de forma espontánea, una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión que se mantiene durante las 24 horas siguientes. Esta conducta rotatoria es debida al desequilibrio que existe entre el contenido de dopamina en el estriado homolateral y contralateral a la lesión, de tal forma que el animal tiende a rotar siempre hacia el lado contralateral al estriado dominante (Deumens et al., 2002).

La lesión unilateral de la SN induce cambios neuroquímicos y electrofisiológicos en el sistema nigroestriatal que intentan compensar el déficit de dopamina inducido por la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Schober, 2004). La administración de 6-OHDA en la SN o en el haz nigroestriado induce una degeneración estática, rápida y casi completa de las neuronas dopamina de la SN. Esta degeneración difiere sustancialmente de la que ocurre en la EP en la que hipotéticamente la pérdida neuronal es lenta y progresiva (Deumens et al., 2002). Es un modelo imperfecto ya que no manifiesta todos los síntomas, pero, sin embargo, resulta muy útil para testar terapias sintomáticas, estrategias neuroprotectoras y trasplantes celulares (Schober, 2004).

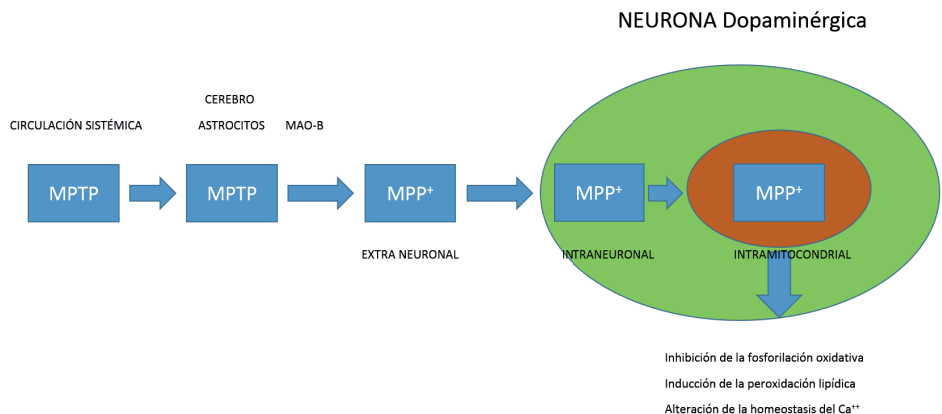
**MPTP:** La 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) es un derivado meperidínico. Es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, ya que es altamente lipofílico, y es transformado en células no dopaminérgicas a 1-metil-4-fenilpiridina ( $MPP^+$ ), que será captado por el transportador de dopamina provocando la degeneración dopaminérgica al actuar como un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Bové et al., 2005; Schober, 2004). Este bloqueo produce una reducción en la síntesis de ATP celular.

Fue descubierta en un grupo de heroínómanos que, de forma accidental, se inyectaron heroína contaminada con esta sustancia. Estos sujetos mostraban una sintomatología que revertía con L-dopa o agonistas dopaminérgicos. Posteriormente, se comprobó que su administración a animales de laboratorio y fundamentalmente a primates, replicaba los signos característicos de la EP, incluyendo temblor, rigidez, inestabilidad postural y bradicinesia y producía un síndrome parkinsoniano asociado a una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SN.

Diversos estudios han mostrado que el  $MPP^+$  puede actuar también inhibiendo directamente los complejos III (ubiquinol ferrocitocromo C óxido reductasa) y IV (ferrocitocromo C óxido reductasa o citocromo C oxidasa) de la cadena transportadora de electrones (Mizuno et al., 1988). La pérdida de energía a través de cada una de estas vías tiene múltiples consecuencias, incluyendo la formación de radicales libres (que reaccionan para formar  $H_2O_2$ ) y la formación de radicales hidroxilo. El fallo energético que tiene lugar en el interior de las neuronas dopaminérgicas como consecuencia del bloqueo del complejo I mitocondrial no parece ser la causa inmediata de la muerte neuronal en la SNpc, sino que es

debida a la acción de los componentes generados en la célula de manera secundaria (Cleeter et al., 1992).

Una limitación del MPP<sup>+</sup> es que esta droga no es adecuada para la administración sistémica porque no atraviesa la barrera hematoencefálica (Shimohama et al., 2003) pero sí su precursor MPTP cuyo efecto es similar entre primates y roedores. El MPP<sup>+</sup> es útil administrado durante 4 días directamente a cultivos neuronales *in vitro*. Los cultivos primarios mesencefálicos de ratas fetales y los cultivos de neuronas dopaminérgicas procedentes de líneas celulares son muy adecuadas para el estudio en detalle de mecanismos de degeneración neuronal dopaminérgica y para la investigación sobre nuevos agentes farmacológicos beneficiosos para la EP (Kitamura et al., 1998; Sawada et al., 1996).



**Figura 2. Esquema del mecanismo de actuación del MPTP a nivel sistémico.**

La neurotoxicidad del MPTP ha sido demostrada en diversas especies animales incluyendo macacos, ratones negros (C57BL/6) y gatos. No existe una explicación adecuada para la diferente vulnerabilidad de las distintas especies animales al MPTP. Se ha postulado que puede estar relacionada con diferencias en el metabolismo del MPTP y en la distribución y retención cerebral de su metabolito MPP<sup>+</sup> (D'Amato et al., 1987) (**Figura 2**). Para algunos autores, la neurotoxicidad del MPTP es dependiente del contenido en neuromelanina ya que la afinidad del MPP<sup>+</sup> por la neuromelanina es muy alta y este pigmento está presente en las

neuronas dopaminérgicas, mientras que para otros autores la toxicidad está relacionada con la actividad MAO-B a nivel de los capilares cerebrales (D'Amato et al., 1987).

**Reserpina:** es de los primeros modelos farmacológicos desarrollados y su acción se basa en la inhibición del transportador vesicular monoaminérgico y la depleción de dopamina (Betarbet et al., 2002).

**Pesticidas** como paracuat, rotenona y maneb son algunos de las sustancias que permiten obtener modelos de EP. Sus mecanismos de acción están relacionados fundamentalmente con la generación de estrés oxidativo y la inhibición del complejo I mitocondrial (Allain et al., 2008).

**Inhibidores del proteosoma.** El hecho de que las anomalías en el procesamiento de proteínas sean una característica, tanto de la forma familiar como esporádica de la EP, hacen del sistema proteolítico ubiquitin-proteosomal una diana para el desarrollo y utilización de modelos de EP (McNaught and Olanow, 2006). Se han descrito múltiples polimorfismos y diferentes mutaciones en genes específicos ( $\alpha$ -sinucleína, DJ-1 y parkina) que contribuyen a la aparición de la EP en humanos y con los que se han desarrollado modelos animales (Martín-Cano et al., 2013).

### Modelos Genéticos.

El estudio de los genes que se encuentran afectados en la EP podría suponer una ruta para investigar las diferentes vías metabólicas y bioquímicas involucradas en la patogénesis de la enfermedad. Con este fin se han desarrollado los modelos genéticos, alguno de los cuales se detalla a continuación.

La  **$\alpha$ -sinucleína** es una proteína de función desconocida que se localiza en el sistema nervioso, principalmente en terminales presinápticas. Se expresa sobre todo en el neocórtex, el hipocampo, la SN, el tálamo y el cerebelo. Aunque es una proteína fundamentalmente neuronal, también se encuentra en células gliales. En condiciones patológicas se agrega y forma fibrillas insolubles que se integran en los cuerpos de Lewy (Glover et al., 1977). Se han creado diferentes líneas de ratones *knock-out* para  $\alpha$ -sinucleína que presentan una resistencia alta (Thiffault et al., 1995) o parcial (Ansari et al., 1993; Kushleika et al., 1996) a la intoxicación con MPTP.

**DJ-1** es una proteína ubicua. Descrita inicialmente como un oncogén, se ha demostrado que participa en la protección frente al estrés oxidativo (Müller et al., 1998; Tatton, 1996;

Wilfried et al., 1996). Se han desarrollado ratones *knock-out* para DJ-1 (viables y fértiles) que no muestran anormalidades neuronales ni anatómicas (Tatton and Greenwood, 1991), pero son más sensibles a la intoxicación con MPTP, con mayor pérdida neuronal en la SNpc y mayor denervación dopaminérgica en el estriado (Tatton and Greenwood, 1991).

**Gen Parkina:** El parkinsonismo autosómico recesivo juvenil se debe a mutaciones en el gen de la parkina (Cohen et al., 1984). Por ello, se creyó que los ratones deficientes en parkina reproducirían las alteraciones motoras y neurológicas del parkinsonismo juvenil. Sin embargo, estos ratones no presentan sistemáticamente déficits en su función neurológica, emocional, de aprendizaje o de memoria que puedan asemejarse al parkinsonismo. No se han encontrado alteraciones motoras ni depleción dopaminérgica, ni pérdida neuronal en la SNpc (Lücking et al., 2000).

***Drosophila melanogaster:*** las moscas transgénicas son buenos modelos genéticos de la EP (Feany and Bender, 2000). Sin embargo, la principal desventaja es que presentan un sistema nervioso mucho más simple que el de roedores y primates, así como un rango limitado de comportamientos locomotores que se puedan testar (Maries et al., 2003).

Trabajar con roedores y primates supone un alto coste económico, de ahí que se estén desarrollando nuevos modelos genéticos en otros organismos como peces (pez cebra), anfibios y lombrices (Pienaar et al., 2010).

## **1.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA**

### **1.2.1 Generalidades.**

El SRA es un sistema hormonal que ejerce un papel importante en la regulación de la actividad simpática, la presión arterial y el balance hidromineral (Averill and Diz, 2000; Seltzer et al., 2004). En él interactúan varias hormonas y enzimas para formar la angiotensina II (AII), su principal péptido efector. La administración central de AII produce, a través de su unión a receptores específicos, aumento de la presión arterial, liberación de vasopresina, ingesta de agua y sal, excreción urinaria de sodio y potasio, y disminución del volumen urinario. Este sistema representa uno de los filogenéticamente más antiguos y fue descrito por Tigerstedt y Bergman en 1898, (Tigerstedt and Bergman, 1898).

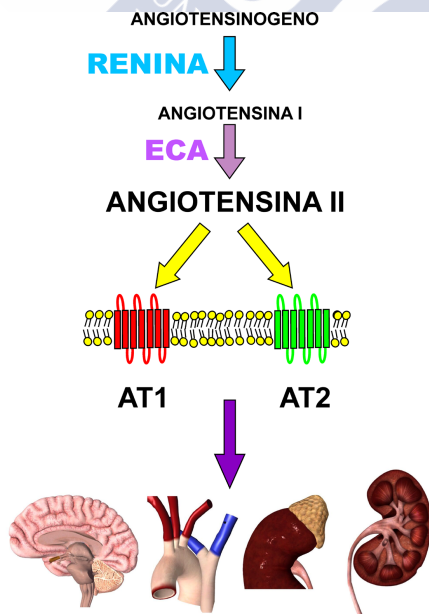
**El SRA clásico** es el SRA circulante o endocrino. En este sistema clásico la AII es generada a partir del angiotensinógeno, a través de una cascada enzimática donde intervienen en un primer momento la renina. La renina se sintetiza en forma inactiva (prorenina) (PRR)



## Introducción

en las células yuxtaglomerulares (YG) localizadas en los riñones. Cuando desciende la presión arterial se producen una serie de reacciones intrínsecas en los riñones que provocan la escisión de moléculas de PRR y la liberación de renina. Ésta se incorpora a la circulación sanguínea renal. La renina actúa enzimáticamente sobre otra proteína plasmática, el angiotensinógeno, para liberar la Angiotensina I (AI). A partir de ésta, el Enzima conversor de angiotensina (ECA), origina la AII. La AII formada es convertida, por acción de la amilopeptidasa A, en angiotensina III (AIII) (2-8) que, a su vez, es metabolizada por la aminopeptidasa B o N dando lugar a la angiotensina IV (AIV) (3-8). Existen además rutas alternativas en las que la AI es transformada por acción de la ECA-2 en angiotensina 1-9, inactiva, que a su vez puede ser transformada al péptido activo angiotensina 1-7 A(1-7) (Jones et al., 2008) (**Figura 3**).

Durante los últimos años, se ha ido ampliando el conocimiento de este sistema con el descubrimiento de nuevos componentes, por ejemplo, nuevos péptidos biológicamente activos, como la A (1-12), nuevas enzimas, y nuevos receptores como es el caso del receptor Mas (MasR), o el receptor de PRR (Valenzuela et al., 2010), además de nuevas funciones de los componentes clásicos e interacciones entre receptores (Carey, 2005).



**Figura 3.** Esquema representativo de la biosíntesis de la Angiotensina.

Si bien la función clásica de este sistema es la regulación de la presión sanguínea y de la homeostasis de sodio y agua (und Halbach and Albrecht, 2006), en los últimos años, el concepto del SRA ha experimentado cambios sustanciales, uno de ellos es el descubrimiento de los **SRA tisulares o locales**.

En el año 1971 Ganten y cols. (Ganten et al., 1971) demostraron, por primera vez, que los componentes del SRA podían ser producidos localmente a nivel de varios órganos y tejidos, entre los que se incluyen el corazón, riñón y páncreas, así como también en el aparato reproductor, sistema linfático, en tejido adiposo y cerebro (Benigni et al., 2010). Estos SRAs locales parecen ser regulados independientemente del SRA circulante, pero también pueden interactuar con este último. De esta manera, los efectos del SRA local pudieran ocurrir en las mismas células que producen los péptidos (efecto intracrino y autocrino), en células vecinas (efecto paracrino) (Labandeira-Garcia et al., 2013) o a través de la circulación a órganos o tejidos específicos (Miyazaki and Takai, 2006; Paul et al., 2006). El estudio de estos SRA locales e intracelulares ha puesto de manifiesto la existencia de otros efectos de la AII completamente diferentes a los del sistema clásico, tales como efectos pro-inflamatorios, proliferativos y pro-fibróticos (Labandeira-Garcia et al., 2012).

### **1.2.2 Receptores de Angiotensina II.**

La AII ejerce sus acciones a través de sus receptores específicos: receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2).

**Receptores AT1:** los receptores AT1 se encuentran localizados predominantemente en el tejido vascular y miocárdico y también en el cerebro, riñón y células glomerulares de las suprarrenales, las cuales secretan Aldosterona (Jackson and Garrison, 1996). El gen humano AT1 se localiza en el cromosoma 3q y codifica para una proteína de 40-42 KDa (359 aminoácidos). La mayoría de las especies expresan un único gen autosómico AT1, pero en roedores hay dos genes relacionados que son denominados AT1a y AT1b. Estos dos receptores son idénticos en el 95% de sus secuencias aminoacídicas. Ambos son similares en cuanto a la unión al ligando y activación pero difieren en su distribución, localización cromosómica y regulación transcripcional (de Gasparo et al., 2000; Inagami et al., 1992; Iwai and Inagami, 1992). La mayoría de las acciones biológicas de la AII, mediadas por el receptor AT1, son efecto vasoconstrictor, estimulación de la síntesis y liberación de aldosterona, reabsorción tubular renal de sodio, crecimiento cardíaco, proliferación de músculo liso

vascular, aumento de la actividad noradrenérgica periférica, aumento de la actividad central del sistema nervioso simpático, estimulación de la liberación de vasopresina, por medio de cascadas clásicas activadas por proteínas G e inhibición de la renina renal. Otras vías de señalización iniciadas por la unión de la AII a los receptores AT1 son reacciones dependientes de fosforilación, algunas de las cuales implican el incremento en la expresión de factores de transcripción tales como c-Fos y c-Jun (Culman et al., 2002). En los últimos años se ha visto una clara implicación de la AII a través de AT1 en la activación de procesos inflamatorios y generación de estrés oxidativo (Cassis et al., 2010; Saavedra et al., 2011).

**Receptores AT2:** los receptores AT2 muestran una homología del 32-34% con respecto a los AT1 en cerebro de rata y representan una proteína de 363 aminoácidos con siete dominios transmembrana hidrofóbicos unidos a proteína G (Kambayashi et al., 1993; Nakajima et al., 1993).

Ambos receptores de AII (AT1 y AT2) poseen una afinidad similar por la AII, pero distinta afinidad por antagonistas de receptores AT1 como losartán y candesartán (alrededor de 10.000 veces más por AT1 que por AT2), o por compuestos de la familia de antagonistas de AT2 como por ejemplo PD123177 y PD1223319 (cerca de 3.500 veces mayor afinidad por AT2 que por AT1). Así, los receptores AT1 y AT2 parecen mediar efectos opuestos sobre el crecimiento y la diferenciación celular, tono vascular y la liberación de la vasopresina. Los receptores AT2 parecen contrarrestar la acción mediada por los receptores AT1, resultando en una disminución de la proliferación celular, disminución de los niveles séricos de vasopresina o disminución de la respuesta vasoconstrictora. Además, en líneas de células neuronales, los receptores AT2 ejercen efectos antiproliferativos y promueven el sobrecrecimiento neurítico, un efecto acompañado por cambios significativos en los patrones de expresión genética de crecimiento y diferenciación relativa a los genes (Chung et al., 1999).

### **1.2.3 Sistema Renina-Angiotensina en el Cerebro.**

El cerebro, incluyendo los ganglios basales y el sistema dopaminérgico, tiene su propio SRA, con todos sus componentes (Allen et al., 1992; Medelsohn et al., 1993; Phillips and De Oliveira, 2008; Saavedra, 2005). Los primeros indicios que apoyaban la inicial hipótesis surgieron cuando se vio que el angiotensinógeno, la AI y la AII no pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Algunos de los componentes del SRA local están ampliamente distribuidos por todo el cerebro mientras que otros tienen una distribución más restringida (Davisson,

2003), lo que indica que la formación de los distintos péptidos requiere de múltiples interacciones celulares. Una hipótesis sugiere que el cerebro posee mecanismos enzimáticos alternativos, distintos de los del sistema clásico (Saavedra, 2005). También se ha observado que los niveles de AII en el cerebro son mucho más elevados que los niveles circulantes (Hermann et al., 1983) y que el precursor proteico angiotensinógeno es principalmente producido por astrocitos (Milsted et al., 1990; Stornetta et al., 1988) aunque es también producido a bajos niveles en neuronas (Kumar et al., 1988; Thomas et al., 1992).

El papel del SRA en el cerebro fue inicialmente asociado con los efectos del SRA circulante en áreas involucradas en el control central de la presión arterial y la homeostasis del sodio y del agua, las cuales están localizadas en órganos circunventriculares que están desprovistos de barrera hematoencefálica (Phillips and De Oliveira, 2008; und Halbach and Albrecht, 2006). En cambio, en estas últimas décadas, en las que todos los componentes del clásico SRA han sido identificados en diferentes áreas del cerebro dentro de la barrera hematoencefálica se ha descubierto que el SRA cerebral está involucrado en otras funciones y enfermedades (Kerr et al., 2005; Maul et al., 2005; Saab et al., 2007; Saavedra, 2005).

Cabe destacar que el SRA cerebral no es totalmente independiente del sistema periférico, ya que la AII periférica puede interactuar en regiones específicas del mismo, concretamente, a nivel de los órganos circunventriculares (zonas específicas del SNC que carecen de una barrera hematoencefálica normal) (Pan, 2004).

Además del “clásico” SRA humoral y del SRA local o tisular, estudios recientes apoyan la existencia de un tercer nivel de SRA en muchos tipos celulares (Baker et al., 2004) llamado *SRA intracelular o intracrino*. La existencia de este nuevo SRA abre nuevas perspectivas para entender los efectos de SRA y sus enfermedades asociadas (Kumar et al., 2007, 2009).

#### **1.2.4 Sistema Renina-Angiotensina en el sistema nigro-estriatal.**

En recientes investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio (Garrido-Gil et al., 2013; Joglar et al., 2009; Rodriguez-Pallares et al., 2008; Valenzuela et al., 2010), usando microscopio de láser confocal y otros métodos, se ha demostrado la presencia de receptores de AT1 y AT2 en neuronas dopaminérgicas de la SN y en células gliales en roedores, primates y humanos (Garrido-Gil et al., 2013) y en cultivos mesencefálicos primarios (Joglar et al., 2009; Rodriguez-Pallares et al., 2004). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado, por primera vez, receptores de PRR en neuronas dopaminérgicas de la SN y células microgliales humanas,

de mono y de rata (Garrido-Gil et al., 2013; Valenzuela et al., 2010). Es de resaltar que inmunohistoquímica hecha en estas células puso de relieve la presencia de los receptores de AT1 y AT2 no sólo en la superficie celular sino también intracelularmente (Garrido-Gil et al., 2013). Así, nuestras observaciones apoyan la existencia de un SRA intracelular/intracrino en neuronas, en particular en las dopaminérgicas, como previamente se sugirió para otros tipos celulares (Baker et al., 2004; Kumar et al., 2007, 2009).

### **1.2.5 Sistema Renina-Angiotensina y Enfermedad de Parkinson.**

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre el SRA y enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP. Varios de ellos han mostrado que la AII y sus receptores juegan un papel importante en funciones estriatales y dopaminérgicas (Banks et al., 1994; Jenkins et al., 1997; Rodríguez-Pallares et al., 2004). En el estriado de pacientes con EP se ha observado una marcada reducción en la expresión de los receptores AT1. Por otro lado, se ha publicado que los niveles de los receptores AT2 están disminuidos en el núcleo caudado, pero no en el putamen, ni en la SNpc (Ge and Barnes, 1996). También se ha visto que la ECA está ampliamente distribuida en el cerebro, incluyendo la vía nigroestriatal y los ganglios basales (Chai et al., 1990; Jenkins et al., 1997; Strittmatter et al., 1985) y que pacientes con EP presentan un incremento en su actividad a nivel del fluido cerebroespinal (Konings et al., 1994). Se ha observado además, una asociación entre polimorfismos genéticos del gen que codifica la ECA y la EP (Lin et al., 2002).

Además, en los últimos años, se ha relacionado el SRA con procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, dos de los principales mecanismos patogénicos en la EP, comprobándose que la AII tiene acciones pro-inflamatorias y que es capaz de producir ROS a través de la activación del complejo NADPH-oxidasa, vía AT1, lo cual podría contribuir al menos en la progresión de la enfermedad (revisado en Labandeira et al., 2011 y Mertens et al., 2009).

La inyección intraestriatal de 6-OHDA provoca un estado oxidativo e inflamatorio mediante la activación de la microglía y del complejo NADPH oxidasa (Rodríguez-Pallares et al., 2007; Sánchez-Iglesias et al., 2007). Lo mismo ocurre en modelos animales de EP tratados con las neurotoxinas MPTP o rotenona. Este estado oxidativo e inflamatorio está mediado, al menos en parte, por AII, como demuestra el tratamiento con candesartán, antagonista de los receptores AT1, que inhibe la activación de la microglía y del complejo NADPH-oxidasa disminuyendo la degeneración dopaminérgica (Rodríguez-Pallares et al., 2008). Por otra parte, el bloqueo del receptor AT1 con ZD

7155 en un modelo de rata lesionada con 6-OHDA, reduce la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas en estriado y mesencéfalo ventral, consiguiendo, con ello, neuroprotección en la SN (Rodríguez-Pallares et al., 2012b). Resultados comparables se obtuvieron con apocinina, un inhibidor del complejo NADPH-oxidasa, sugiriendo que la neuroprotección del antagonista de AT1 se basa en la reducción de la actividad NADPH-oxidasa (Joglar et al., 2009; Rey et al., 2007). De este modo, se demuestra que, la manipulación del SRA podría frenar la progresión de la EP y constituir una estrategia neuroprotectora efectiva frente a la degeneración dopaminérgica (Labandeira-García et al., 2014; Labandeira-García et al., 2013).

Un estudio clínico reciente ha evaluado la asociación entre el empleo de fármacos antihipertensivos y la EP en pacientes hipertensos. Se examinó la relación entre el uso de bloqueadores de los canales de calcio (BCC), IECA, ARA II y la incidencia de EP usando  $\beta$ -bloqueantes como referencia. El estudio concluye que la utilización de BCC y altas dosis acumulativas de IECAs y ARA II se asocia a una disminución de la incidencia de la EP en pacientes hipertensos (Lee et al., 2014).

### **1.3 PAPEL DE LA MICROGLÍA Y LA INFLAMACIÓN EN EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

Los datos que evidencian la existencia de células fagocíticas en el SNC se remontan a los trabajos realizados por Nissl, Alzheimer, Cajal y del Río-Hortega durante los siglos XIX y XX y sientan las bases de lo que ahora conocemos como el sistema inmune innato del SNC (Kumar Kaushik and Basu, 2013). Estas células fagocíticas fueron llamadas más tarde “microglía” la cual constituye entre un 10-15 % de las células cerebrales. La microglía tiene características morfológicas y patrones de tinción especiales que la diferencian de neuronas y otras células gliales del SNC. Como los macrófagos del sistema periférico, la microglía es un tipo celular presentador de antígenos y que secreta citoquinas (Hanisch, 2002; Streit et al., 1999) que están involucradas en procesos fisiológicos para combatir los patógenos y reparar tejidos. Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que generalmente se clasifican como pro o anti-inflamatorias. Mientras que las citoquinas pro-inflamatorias tienen la capacidad de provocar una respuesta inmune sostenida, las anti-inflamatorias regulan a la baja una respuesta inmune mediante la unión a receptores expresados en la microglía e inician un proceso de señalización autocrina. Las citoquinas tienen numerosos efectos sobre la función

del SNC, incluyendo la promoción del crecimiento, la inhibición y la proliferación de astrocitos y oligodendrocitos (Hanisch, 2002) y la modulación de la liberación de neurotransmisores (Zalcman et al., 1994). Muchos estudios han demostrado que las citoquinas pro-inflamatorias se expresan en niveles muy bajos en el cerebro sano, pero en niveles mucho más altos en muestras tisulares de cerebros, así como en el suero y fluido cerebroespinal de pacientes con EP (Boka et al., 1994; Mogi et al., 1994). Se ha postulado que, en el cerebro adulto, la mayor parte de la microglía se encuentra en estado de "reposo", y tiene una morfología ramificada característica. Kreutzberg en el 1996 (Kreutzberg, 1996) propuso un sistema de clasificación según el estado de la microglía *in vivo*, que va de una morfología ramificada que contiene cuerpos celulares pequeños y muchas ramificaciones delgadas, a una morfología ameboide con ramas truncadas (estado activo) para facilitar la proliferación, migración y fagocitosis (Nimmerjahn et al., 2005). Microglía en "reposo", en contra de lo que su nombre indica, no es estática, las células se mueven constantemente. Dos estudios que utilizaron muestras de ratones, mostraron que las células microgliales se expanden y se retraen rápidamente de forma dinámica (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). La activación de la microglía se produce durante el desarrollo y remodelación del cerebro sano. La apoptosis se produce durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano del cerebro para evitar la producción excesiva de células (Ashwell, 1990; Batchelor et al., 1999).

Uno de los métodos más comúnmente utilizados para la activación de la microglía, tanto *in vitro* como *in vivo*, es la aplicación de la endotoxina lipopolisacárido (LPS). LPS induce la activación de microglía produciendo citoquinas, quimiocinas, tales como interleucina (IL)-1 $\beta$ , proteínas inflamatorias de macrófagos, (MIP, del inglés *Macrophage Inflammatory Proteins-1 $\beta$* ), MIP-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés, *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) (Kim and de Vellis, 2005).

También se ha sugerido que la activación de la microglía se produce debido a un proceso de "switching-off" en el cual existe un estímulo provocado por las neuronas dañadas sobre la microglía que promueve el paso de estado M0 a M1 de ésta última. Se ha comprobado que neuronas sanas son capaces de disminuir la respuesta microglial con estimulación por LPS a dosis bajas, reduciendo los niveles de óxido nítrico (NO) y de TNF- $\alpha$  *in vitro* (Chang et al., 2000).

Sin duda, otro de los mecanismos que más puede influir en la progresión de la degeneración dopaminérgica, y que actualmente está siendo objeto de un estudio profundo, es

el debido a la capacidad que tiene la microglía activada de producir y liberar ROS y especies reactivas de nitrógeno : (RNS, del inglés: *reactive nitrogen species*), debido a la catálisis por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Babior, 1999). Estos radicales libres, altamente reactivos, pueden causar la muerte celular neuronal y, ya desde el año 1992 se han implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (Chao et al., 1992).

El estrés oxidativo tiene un papel determinante en la muerte neuronal dopaminérgica en EP (Jenner et al., 1992). Los niveles basales de la peroxidación lipídica se incrementan en el SN de los pacientes EP (Dexter et al., 1989), lo que sugiere que esta área de cerebro es particularmente vulnerable al exceso de radicales libres y ROS que pueden ser producidos por microglía activada como parte de la respuesta inflamatoria.

La primera evidencia del papel clave de la inflamación en la EP se produjo a partir de un estudio post-mortem en 1998, en el cual McGeer y col. encontraron microglía activada y linfocitos T en la SNpc de un paciente con EP. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios que apoyan esta teoría (Hirsch and Hunot, 2009; McGeer and McGeer, 2004; Tansey et al., 2007). Además de microglía activada y citoquinas proinflamatorias, también se ha estudiado la presencia de enzimas asociadas con la inflamación, tales como óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX2), encontradas en muestras tisulares *postmortem* de cerebros de pacientes con EP (Hunot et al., 1996; Knott et al., 2000). Debido a la participación de la inflamación mediada por la microglía en la EP se ha postulado que puede producirse un ciclo vicioso de inflamación, independientemente de la lesión inicial. Cuando la microglía se activa, ya sea a través de una toxina, un patógeno o una proteína endógena, o indirectamente a través de señales de neuronas dañadas, puede persistir debido a la retroalimentación positiva de las neuronas que mueren, incluso si la lesión inicial ha cesado. Así, la activación microglial, y por lo tanto la neuroinflamación, pueden propagarse y prolongarse indefinidamente para producir la destrucción de las neuronas en un proceso denominado microgliosis reactiva, característico de las enfermedades neurodegenerativas (Gao and Hong, 2008).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la activación de la vía Rhoa/ROCK microglial (Villar-Cheda et al., 2012a), está involucrada en incremento de la activación AII/AT1 en la respuesta microglial y en la degeneración dopaminérgica.



### **1.3.1 Subtipos de microglía activada.**

La investigación en torno a la microglía ha seguido un camino similar a la de los macrófagos. Inicialmente las células microgliales se identificaron como células fagocíticas cuya función consistía en mantener limpio el SNC. Con el tiempo, se valoró su potencial inmunológico. El estudio no estuvo exento de dificultades puesto que así como es relativamente fácil obtener macrófagos, las células microgliales no son tan fácilmente obtenibles. Estas dificultades han retrasado la comprensión de los mecanismos relacionados con la inmunidad microglial. Durante muchos años se pensó que las células microgliales adquirirían un estado activo después de una agresión en el SNC, transformándose así en lo que fue denominado "microglía reactiva ". Este estado activo, caracterizado por la adquisición de una forma ameboide y por la expresión de factores pro-inflamatorios, fue considerado perjudicial para el destino neuronal. Por lo tanto, la activación microglial fue visto más como un problema que una ventaja, y, se propusieron una gran cantidad de fármacos para prevenir dicha activación (Aisen, 2002; Block and Hong, 2005; Gao et al., 2003). Sin embargo, las similitudes entre los macrófagos y microglía han llevado a la sospecha de que esta última también podría tener una vía de activación alternativa que podría ser beneficiosa en lugar de perjudicial para las neuronas.

### **1.3.2 Mecanismos de polarización microglial.**

En respuesta a lesiones, la microglía o los macrófagos son capaces de adquirir fenotipos muy diversos y complejos, lo que les permite participar en la respuesta citotóxica, la regulación inmune y la reparación del daño o lesión (**Figura 4**). La nomenclatura de estos fenotipos varía según la literatura (Kreider et al., 2007). Se puede caracterizar en cuatro estados principales:

- M1: clásicamente activado y con propiedades citotóxicas e inflamatorias
- M2: M2a con participación en fenómenos de reparación y regeneración mediante moléculas reguladoras y anti-inflamatorias; M2b con un fenotipo inmunorregulador, o M2c con un fenotipo de desactivación adquirida. El fenotipo M2d no ha sido identificado aunque se ha sugerido que aparece en condiciones carentes de oxígeno (Girard et al., 2013).

Los diferentes subtipos de microglía activada fueron caracterizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Cabe señalar que la mayor parte de las respuestas microgliales que ocurren *in vivo* resultan de la coexistencia de los diferentes subtipos de microglía activada. Además, la idea de la existencia de un estado de microglía “en reposo” (también llamado fenotipo M0) se encuentra en debate (Cherry et al., 2014a, b). Se ha demostrado que las células microgliales están activas bajo condiciones fisiológicas (Nimmerjahn et al., 2005). Las células microgliales “en reposo” contribuyen significativamente a la promoción de la homeostasis inmune, a la producción de una variedad de citoquinas y factores neurotróficos como el IGF-1 (del inglés *insulin-like growth factor-1*) y BDNF (del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) y a la participación en constante diafonía con las neuronas vecinas. Por lo tanto, desde un punto de vista funcional, la microglía M0 puede ser considerada como un fenotipo atenuado de M2. La polarización de la microglía se ha analizado en cultivos primarios de microglía de ratones tratados con LPS o IL-4. En el tratamiento *in vitro* de cultivos primarios o líneas celulares microgliales con LPS se induce a la adquisición de un fenotipo M1 caracterizado por la liberación moléculas pro-inflamatorias tales como IL-1b, IL-2, iNOS, la ciclooxigenasa 2 (COX2) o TNF- $\alpha$  (Chhor et al., 2013; Fenn et al., 2012; Varnum and Ikezu, 2012). Por otro lado, el tratamiento de células microgliales primarias con IL-4/IL-13 o IL-10 conducen a los fenotipos M2a y M2c respectivamente (Mantovani et al., 2004), que se caracterizan por la expresión de moléculas anti-inflamatorias como IGF-1 para el fenotipo M2a o CXCL13 y supresor de citoquinas de señalización 3 para el fenotipo M2c (Colton, 2009; Chhor et al., 2013; Fenn et al., 2012; Hu et al., 2012; Varnum and Ikezu, 2012). Dependiendo del momento del análisis de la microglía de animales tratados con LPS la expresión de los diferentes fenotipos varía (Fenn et al., 2012). Todos los animales adultos expresan marcadores M1 y M2 pero en los animales envejecidos la expresión de citoquinas pro-inflamatorias se incrementa (Crain et al., 2013). También es destacable que el envejecimiento reduce la plasticidad celular microglial por perder su sensibilidad a la IL-4.

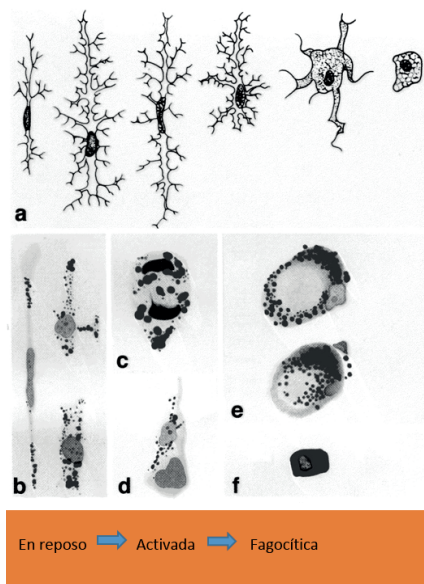


Figura 4. Esquema representativo de los diferentes estados de la microglía. Modificado de Kreutzberg, 1996.

### 1.4 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

El TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria y de defensa que juega un papel muy importante en los desórdenes neurodegenerativos (Fillit et al., 1991; Hofman et al., 1989; Mogi et al., 1994). Se produce principalmente en macrófagos en respuesta a un daño tisular o infección (Ehlers, 2003; Epstein et al., 2001; Flier et al., 1996; Krueger and Callis, 2004). Pertenece a una familia de ligandos que inician señales para la proliferación celular y apoptosis, y que se encuentran en casi todas las células (Flier et al., 1996; Krueger and Callis, 2004; Locksley et al., 2001; Mauri et al., 1998; Mease, 2002).

La señalización intracelular mediada por TNF- $\alpha$  se produce a través de interacciones con dos receptores de membrana: TNFR1 y TNFR2 (del inglés, *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptor 1* y *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptor 2*). El principal receptor responsable de la señalización intercelular parece ser TNFR1, mientras que TNFR2 potencia esta actividad. De esta manera, TNFR2 podría incrementar la sensibilidad de una célula a la estimulación de TNF- $\alpha$  (Amar et al., 1994). TNFR1 y TNFR2 se expresan constitutivamente en prácticamente todas las células de los tejidos. Ambos tipos de receptores son típicas proteínas transmembrana tipo I con dominios extracelulares e intracelulares (Wajant et al., 2003). La

unión a estos receptores inicia la transducción de señales (Mease, 2002). Mientras la unión de TNF- $\alpha$  a su receptor TNFR1 se asocia predominantemente con la inflamación y la neurodegeneración, la unión a TNFR2 está involucrado en la regeneración de tejidos y la neuroprotección (McCoy and Tansey, 2008).

En la enfermedad neurodegenerativa aguda o crónica, el TNF- $\alpha$  se libera predominantemente por medio de la microglía activada y puede contribuir a lesiones tisulares primarias o secundarias (McCoy and Tansey, 2008). En el caso de la EP, se ha observado que la inyección de TNF- $\alpha$  en el fascículo prosencefálico medial causa degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SN de ratas tratadas (Carvey et al., 2005). El tratamiento de ratones knockout para TNFR con MPTP mostró una protección frente a la neurotoxicidad inducida por MPTP sugiriendo, de esta manera, un rol determinante de TNF- $\alpha$  en la degeneración de la EP (Sriram et al., 2002). En el hipocampo, sin embargo, los ratones knockout TNFR mostraron un daño neuronal exagerado después de tratamiento con MPTP. Conjuntamente estos resultados son indicativos de un papel dual para TNF- $\alpha$  en el cerebro: por una parte promotor de la neurodegeneración en el estriado y por otra protector contra la neurodegeneración en el hipocampo (Shohami et al., 1999).

TNFR1 puede exacerbar la neurodegeneración a través de varias vías, que están mediadas principalmente por la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B, del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). En primer lugar, por la activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B en las células endoteliales que puede inducir la expresión de moléculas de adhesión celular promoviendo así la transmigración de las células inmunes en el parénquima del SNC (Zhou et al., 2007). En segundo lugar, en las células gliales, en particular, microglia, la activación mediada por TNF- $\alpha$  en la vía de señalización de NF- $\kappa$ B puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL- 6, IL- 8, y la propia TNF- $\alpha$ . TNFR1 amplifica la respuesta inflamatoria promoviendo así la neurodegeneración. De hecho, la inhibición específica de la señalización de NF- $\kappa$ B en ratones transgénicos suprime la respuesta inflamatoria del SNC en varios modelos de enfermedades animales, tales como lesión de la médula espinal, EAE, y neuritis óptica, reduciendo de ese modo la neurodegeneración y la mejorando la recuperación funcional (Brambilla et al., 2005; Brambilla et al., 2012; Brambilla et al., 2009). TNF- $\alpha$  puede contribuir a la neurodegeneración crónica mediante la generación

y liberación de ROS y de especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Kilbourn et al., 1990; Mir et al., 2008).

### **1.5 COMPLEJO NADPH-OXIDASA**

NADPH-oxidasa es un complejo enzimático que cataliza la formación de radicales superóxido y constituye una de las fuentes endógenas más importantes de ROS en el organismo después de la mitocondria (Babior, 1999, 2004). Este sistema comprende un complejo flavocitocromo b558, formado por las subunidades p22 y gp91, unido a membrana, y factores citosólicos p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y la pequeña GTPasa Rac2, que se traslocan a la membrana plasmática donde experimentan un proceso de ensamblaje que conforma el sistema enzimático activo. El conocimiento de las interacciones proteína-proteína que permiten el ensamblaje y el mecanismo de acción enzimático, ha permitido detectar los cambios que transcurren en el estado activo (Babior, 2000). El producto final de la activación es la formación de ROS.

Estudios en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto una intensa inmunoreactividad para subunidades de NADPH en las células microgliales, neuronas y astrocitos (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008).

Los radicales libres producidos en el complejo NADPH-oxidasa, tales como el anión superóxido, son deletéreos para las neuronas, especialmente para las dopaminérgicas, células muy vulnerables al daño oxidativo. Además, este superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico formando peroxinitrito que es aún más tóxico que los anteriores (Liu, 2006). Por otro lado, ROS pueden actuar sobre las vías de señalización intracelulares que inducen la activación microglial e incrementar, de este modo, la producción de moléculas pro-inflamatorias (Qin et al., 2004). La respuesta inflamatoria en torno a las neuronas y terminales muertas puede inducir un daño no específico en otras neuronas y contribuir así a la progresión a largo plazo de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, tal y como se ha observado en las enfermedades autoinmunes (Vowinckel et al., 1997).

### **1.6 VÍA RHOA/ROCK**

La familia Rho de GTPasas (guanosinas trifosfatasa) es una familia de pequeñas proteínas G de señalización que comprende más de 100 proteínas estructuralmente relacionadas. Los miembros de la familia Rho GTPasa regulan muchos aspectos de la actina intracelular, desempeñan un papel en la proliferación celular, la apoptosis, la expresión de

genes y se encuentran en todos los organismos eucariotas, incluyendo levaduras y algunas plantas. Estas GTPasas experimentan cambios en su conformación espacial y su localización subcelular dependiendo del nucleótido de guanina. Las GTPasas son activas cuando tienen unido GTP e inactivas cuando contienen GDP (guanosín difosfato). En su estado activo se unen a sus efectores, que a su vez, regulan un gran número de funciones biológicas (Bishop and Hall, 2000; Mueller et al., 2005; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

La superfamilia de las GTPasas, pequeñas según sus relaciones estructurales y funcionales, se ha subdividido en 5 subfamilias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran. Los miembros de la subfamilia Rho (RhoA, RhoB, Rac1 y Cdc42) son de especial interés, ya que controlan la formación de las distintas estructuras que conforman el citoesqueleto de la actina (Ding et al., 2011; Jalil et al., 2005). Además, regulan muchas otras funciones, entre las que se incluyen la transcripción génica y el metabolismo lipídico. RhoB tiene acciones opuestas a RhoA e inhibe la expresión génica mediada por RhoA. Los efectos de RhoA en la arquitectura celular están mediados por las proteínas serina/treoninquinasa dependientes de Rho (Aspenström, 1999) y se dividen en dos subgrupos: las proteinquinasa PKC/PKN y las Rho-quinasa (ROCK1 y ROCK2) (Mueller et al., 2005).

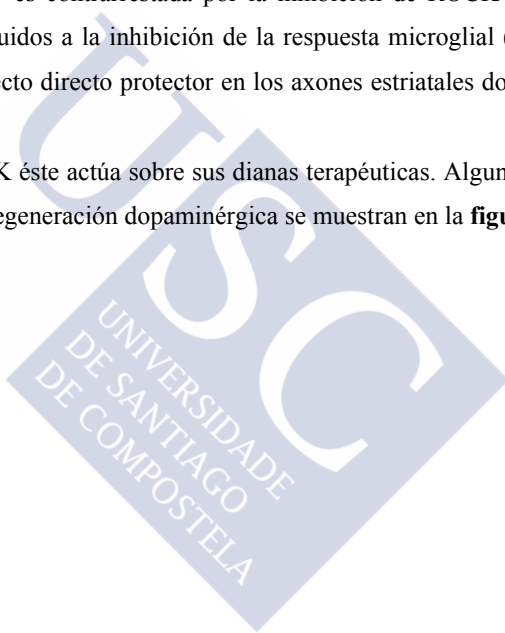
RhoA, perteneciente a la familia Rho, inicia procesos celulares y actúa directamente con su efector ROCK (quinasa asociada a Rho) (Katoh et al., 1998; Zhang et al., 2007). ROCK es una serina/treoninquinasa, identificada hace aproximadamente 16 años como una proteinquinasa dependiente de Rho y de masa molecular 160 kDa (Clerk and Sugden, 2000; Mukai et al., 2001). Se conocen dos isoformas, codificadas por dos genes diferentes: ROCK I y ROCK II (Nakagawa et al., 1996). Las dos isoformas tienen una coincidencia del 65% en su secuencia aminoacídica y del 92% en sus dominios quinasa (Amano et al., 2000; Kang et al., 2011; Riento and Ridley, 2003). A pesar de la gran similitud en las secuencias aminoacídicas de ambas isoformas se ha visto una gran diferencia en cuanto a su distribución en los tejidos, lo que indica la existencia de distintas funciones para cada isoforma. ROCK II se expresa principalmente en cerebro, mientras que ROCK I muestra los niveles más altos de expresión en tejidos no neuronales, entre los que se incluyen corazón, pulmón y músculo esquelético (Mueller et al., 2005).

Se ha demostrado que la activación de la vía RhoA/ ROCK está involucrada en la patogénesis de enfermedades neurológicas que cursan con un importante componente neuroinflamatorio, como es el caso del infarto cerebral, la enfermedad de Alzheimer y la

esclerosis múltiple, entre otras (Kubo and Yamashita, 2007; Shin et al., 2008). Además, también se sabe que la activación de ROCK tiene un papel determinante en el bloqueo y la retracción axonal y que su inhibición induce efectos terapéuticos de estabilización axonal y crecimiento de neuritas (Gallo, 2004; Katoh et al., 1998; Lehmann et al., 1999). Se ha probado además que dicha inhibición favorece la supervivencia neuronal en modelos de enfermedad de Huntington (Bowerman et al., 2012), esclerosis lateral amiotrófica (Tönges et al., 2014) y degeneración retinal (Bermel et al., 2009; Koch et al., 2014).

En el caso de la EP, nuestro grupo ha demostrado, por primera vez, que la degeneración dopaminérgica propia de la EP es contrarrestada por la inhibición de ROCK y los efectos neuroprotectores han sido atribuidos a la inhibición de la respuesta microglial (Villar-Cheda et al., 2012a) o a un posible efecto directo protector en los axones estriatales dopaminérgicos (Tönges et al., 2012).

Tras la activación de ROCK éste actúa sobre sus dianas terapéuticas. Algunas de las más importantes que median en la degeneración dopaminérgica se muestran en la **figura 5**.



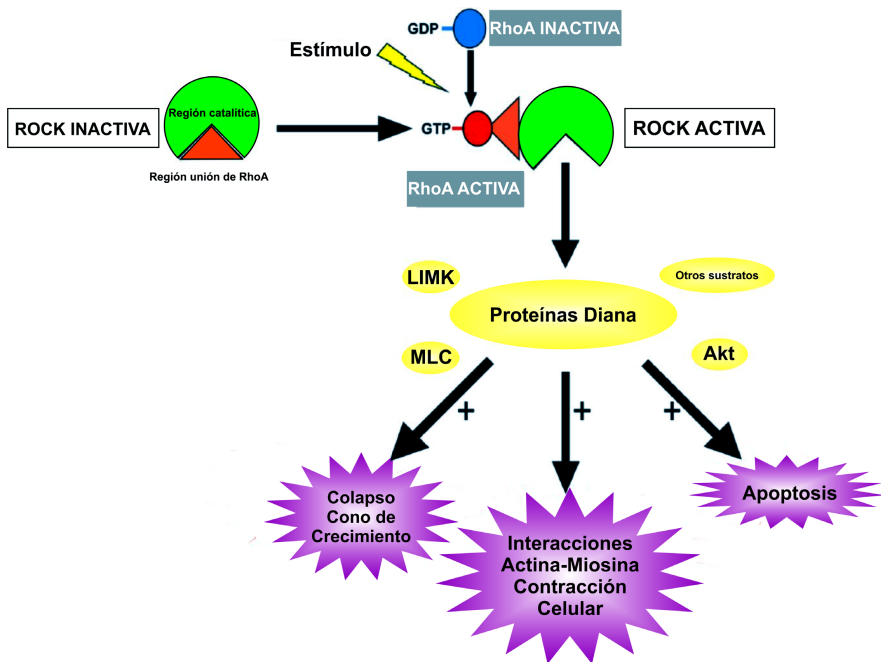


Figura 5. Esquema en el cual se muestran las dianas terapéuticas sobre las que actúa ROCK y sus efectos.  
Figura modificada de Labandeira-García et al, 2014.

Aunque la neuroinflamación fue inicialmente considerada como una simple consecuencia de la degeneración neuronal a día de hoy aún no ha sido demostrado si tiene un papel determinante en la progresión de la muerte celular dopaminérgica a pesar de que es poco probable que sea una causa primaria en la EP (Hirsch et al., 2012; Lindqvist et al., 2013).

Una de las claves en las investigaciones recientes sobre la EP se basa en descubrir los mecanismos implicados en posibles interacciones entre vías como se ha explicado en el párrafo anterior. Muchos mecanismos relacionados con la activación de ROCK tienen una gran importancia en la degeneración dopaminérgica y podrían ser contrarrestados mediante la inhibición de ROCK. Entre ellos, merecen especial atención: (1) La neuroinflamación que juega un papel crucial en la muerte celular dopaminérgica; observándose una marcada reacción microglial en la SN y en el estriado de pacientes y modelos animales de EP (Gerhard et al., 2006; Ouchi et al., 2005; Rodriguez-Pallares et al., 2007). (2) La Degeneración inicial axonal seguida de degeneración neuronal dopaminérgica según el modelo denominado “dying back” (Burke and O'Malley, 2013; Chu et al., 2012). (3) Procesos apoptóticos: son muy importantes en la muerte celular dopaminérgica (Da Costa and Checler, 2011; Levy et al.,



2009). (4) La interrupción de la autofagia en neuronas dopaminérgicas: que está asociado con la progresión de la enfermedad (Dehay et al., 2010) y con la activación de ROCK (Bauer et al., 2009).

Por lo tanto, ROCK II podía ser un punto donde se integren varias vías de señalización intracelular, especialmente aquellas que regulan la contractilidad de las fibras de actina-miosina. En este sentido, se ha descrito que ROCK participa en diferentes procesos fisiológicos modulando la migración, proliferación y supervivencia celular. Por otro lado, la inhibición de ROCK mediante el uso de inhibidores específicos del enzima como Fasudil o Y-27632, ha mostrado que limita la activación leucocitaria e infiltración y disminuye la invasión y metástasis de células tumorales (Ding et al., 2009).

### **1.7 ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y PAPEL DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA, DEL COMPLEJO NADPH-OXIDASA Y DE LA VÍA RHOA/ROCK.**

La AII, el efector más importante de SRA, interactúa con los receptores de AT1 para activar el complejo NADPH-oxidasa microglial el cual media muchos aspectos clave del estrés oxidativo y la inflamación. Se ha observado que la inhibición de la actividad NADPH-oxidasa disminuye la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por diferentes neurotoxinas en modelos experimentales de la EP (Rey et al., 2007; Rodríguez-Pallares et al., 2008; Rodríguez-Pallares et al., 2007; Wu et al., 2003). Nuestro grupo ha demostrado que AII, vía receptores de AT1, incrementa la actividad de la NADPH-oxidasa en la SN (Joglar et al., 2009; Muñoz et al., 2006; Rey et al., 2007; Rodríguez-Pallares et al., 2008) siendo la microglía la principal fuente de ROS derivadas de la activación del complejo NADPH-oxidasa (Block, 2008). Además, también hemos demostrado que el bloqueo de la actividad NADPH-oxidasa en neuroesferas de células progenitoras mesencefálicas induce un aumento en la generación de células dopaminérgicas (Parga et al., 2010). Otros estudios confirman nuestros hallazgos demostrando que la activación de microglía y los radicales libres derivados de la NADPH juegan un papel importante en los efectos de neurotoxinas dopaminérgicas y posiblemente en EP (Peterson and Flood, 2012; Qin et al., 2013; Rodríguez-Pallares et al., 2007; Wu et al., 2003).

En la SN, los receptores de AII y la NADPH-oxidasa se encuentran en neuronas dopaminérgicas y en células gliales. Se han propuesto diferentes mecanismos que median el aumento en la degeneración dopaminérgica. Son los siguientes:

La AII actúa en neuronas, vía receptores AT1, y estimula la producción de bajos niveles de ROS intraneuronal por activación de NADPH-oxidasa neuronal. Las ROS actúan como segundos mensajeros en muchas vías de señalización, incluyendo aquellas involucradas en desencadenar una respuesta inflamatoria y la migración de las células inflamatorias al área lesionada (Babior, 2004; Qin et al., 2004); las ROS derivadas de NADPH también modulan los niveles neuronales de las ROS por interacción con las ROS derivadas de la mitocondria y de otras fuentes, como las derivadas de neurotoxinas dopaminérgicas o de microglía activada. La existencia de una interacción entre las ROS derivadas de NADPH y las ROS derivadas de la mitocondria ha sido recientemente confirmada mediante experimentos con una línea celular dopaminérgica tratada con la neurotoxina MPP<sup>+</sup> y AII (Zawada et al., 2011) y también en nuestro laboratorio, con células dopaminérgicas de cultivos primarios (Rodríguez-Pallares et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2012b).

Por otra parte, la AII activa el complejo NADPH-oxidasa microglial produciéndose así altas concentraciones de ROS que se liberan en el medio extracelular y que pueden afectar a las neuronas dopaminérgicas. Además, las ROS derivadas de la activación del complejo NADPH-oxidasa microglial pueden actuar como segundos mensajeros en varias vías de señalización microgliales implicadas en la respuesta inflamatoria (Hoogwerf, 2010; Qin et al., 2004). De esta manera la AII aumenta el efecto neurotóxico inducido por bajas dosis de neurotoxinas dopaminérgicas y el tratamiento con inhibidores de la ECA (Lopez-Real et al., 2005; Muñoz et al., 2006) o el bloqueo de los receptores de angiotensina, AT1 (Brownfield et al., 1982; Chai et al., 1987; Rey et al., 2007) ha demostrado disminuir significativamente la pérdida de neuronas dopaminérgicas, así como la oxidación de proteínas, la peroxidación de lípidos, y la activación microglial en SN. Además, la pérdida neuronal también se reduce por inhibidores de la activación del complejo NADPH-oxidasa, lo que confirma que la activación de NADPH-oxidasa y los ROS derivados de ésta están implicados en la muerte neuronal dopaminérgica inducida por AII (Brownfield et al., 1982; Chai et al., 1987; Rey et al., 2007). Estudios recientes han revelado varios mecanismos que median en los efectos inducidos por la AII, incluyendo la activación del receptor de PRR/renina, (Quinlan and Phillips, 1981; Valenzuela et al., 2010) la inhibición del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ , del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*) (Garrido-Gil et al., 2012) y la activación de la vía microglial RhoA/ROCK (Villar-Cheda et al., 2012a). Además de los efectos neuroprotectores directos mencionados anteriormente, la inhibición de

AT1 facilita que la AII estimule a los receptores AT2, los cuales pueden promover la regeneración axonal (Lucius et al., 1998; Namsolleck et al., 2013; Rodriguez-Pallares et al., 2008).

La sobreactivación del SRA en el sistema nigroestriatal (aumento de la expresión de los receptores AT1 y disminución de la expresión de los receptores AT2) está asociada con altos niveles de neuroinflamación, marcadores de estrés oxidativo y mayor vulnerabilidad de células dopaminérgicas a neurotoxinas, consituyendo un imporante factor de riesgo en el desarrollo de la EP. En un estudio reciente con ratas macho de edad avanzada, se ha observado sobreactivación del SRA en estos animales comparados con animales jóvenes (Villar-Cheda et al., 2014). Dicha sobreactivación, que podría ser un mecanismo compensatorio relacionado con la disminución de dopamina, fue inhibida por el tratamiento con el antagonista de AT1, candesartán. Nuestro grupo ha demostrado sobreactivación del SRA en modelos experimentales de ratas postmenopáusicas (Rodriguez-Perez et al., 2012; Rodriguez-Perez et al., 2010), en ratas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica (Rodriguez-Perez et al., 2013a) y en ratas macho con respecto a ratas hembra (Rodriguez-Perez et al., 2011).

Aunque hay datos experimentales que apoyan la participación del SRA cerebral en la mayor vulnerabilidad y degeneración dopaminérgica, (Grammatopoulos et al., 2007; Zawada et al., 2011) los datos de estudios clínicos son todavía escasos. El aumento de la actividad del ECA ha sido observado en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP (Konings et al., 1994), al igual que una asociación entre los polimorfismos genéticos del gen de ECA y EP (Lin et al., 2002). El perindopril, un IECA, produce efectos beneficiosos en pacientes con EP (Reardon et al., 2000), aunque también existen casos de parkinsonismo inducido por captopril (Chang and Shih, 2009; Sandyk, 1985). Se evaluó también, el uso de varios tipos de fármacos antihipertensivos en relación con el riesgo de EP en varios estudios de casos y controles (Becker et al., 2008; Pasternak et al., 2012). Sin embargo, el número de pacientes tratados con antagonistas de AT1 era demasiado bajo para realizar un análisis significativo. El rango de dosis de éstos también hace que los datos no sean concluyentes. Por otra parte, la metodología de algunos de estos estudios ha sido cuestionada así como el período de uso de estos fármacos.

También la activación de la ruta RhoA/ROCK está involucrada en la degeneración dopaminérgica y en un aumento de la respuesta microglial que se produce por el efecto de la

AII vía AT1 (Villar-Cheda et al., 2012a) que a su vez activa el complejo NADPH-oxidasa. Esto es debido a que, como se sabe, esta ruta RhoA/ROCK es particularmente importante para la migración de las células inflamatorias hacia las zonas dañadas (Greenwood et al., 2003; Honing et al., 2004). RhoA/ROCK induce cambios en el citoesqueleto de las células inflamatorias activadas, que producen procesos de retracción y cambios en las características de la movilidad celular de estas células inflamatorias, tales como las células microgliales (Yan et al., 2012).

Sheikh y col. (Sheikh et al., 2009) han descrito que el fosfolípido lisofosfatidilcolina es capaz de inducir a través de la activación de ROCK una respuesta proinflamatoria en la que están implicados la activación microglial y astrocitaria, lo cual podría contribuir a procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos que tienen lugar en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la EP.

También se ha descrito que la activación de RhoA promueve la migración transendotelial de monocitos vía ROCK, lo cual podría llevar a desencadenar procesos pro-inflamatorios.

La inhibición de la señalización de Rho-GTPasa resulta en la extensión de neuritas y la reducción sustancial en la expresión de ARN mensajero y proteína de  $\alpha$ -sinucleína en la línea celular dopaminérgica MN9D (Zhou et al., 2011).

Un aumento de la actividad de SRA se traduce en mayor activación de NADPH-oxidasa microglial y una mayor muerte celular. Los factores que provocan un aumento de la actividad de SRA pueden ser, entre otros, la depleción dopaminérgica, edad avanzada y menopausia.

Hemos observado que la depleción de dopamina en el sistema nigroestriatal induce un incremento significativo en la expresión de los receptores AT1 y AT2 y cuando la función dopaminérgica es restituida se produce una disminución de la actividad del complejo NADPH-oxidasa (Villar-Cheda et al., 2010). Más recientemente hemos investigado las posibles interacciones entre AII y receptores de dopamina en ratones *knockout* D1-, D2- y AT1- así como en ratones que sobreexpresan los receptores D2. Se comprobó la existencia de un mecanismo compensatorio, en el estriado y SN de ratones, entre los receptores de dopamina y AII (Villar-Cheda et al., 2014).

Otros factores pueden inducir un incremento en la actividad de SRA independientemente o antes de la pérdida de dopamina. Así, se sabe que las neurotoxinas dopaminérgicas como MPP<sup>+</sup> pueden actuar directamente en astrocitos para inducir un incremento en la producción de factores proinflamatorios (Block et al., 2007; Henze et al., 2005; Khan et al., 2014 ). Los

## ***Introducción***

astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno/angiotensina (Milsted et al., 1990; Stornetta et al., 1988) la cual podrá actuar sobre neuronas y/o células microgliales como se ha indicado anteriormente.





## **OBJETIVOS**



## **2.1 OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de la presente tesis es abordar el estudio de la relación existente entre el sistema renina angiotensina cerebral, la activación microglial y la degeneración dopaminérgica en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.

## **2.2 OBJETIVOS CONCRETOS**

### **2.2.1 Justificación de objetivos 1 y 2**

La EP es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas (Meyer et al., 2010). La neuroinflamación ocurre paralelamente a la pérdida de neuronas dopaminérgicas y está asociada a alteraciones en varios tipos de células, siendo la microglía, el tipo celular más destacado (Vivekanantham et al., 2014).

En modelos animales de la EP, se ha demostrado que la hiperactivación del SRA cerebral local incrementa la respuesta microglial inflamatoria, el estrés oxidativo y la degeneración dopaminérgica siendo todos estos factores inhibidos por bloqueantes de los receptores de AII (Labandeira-Garcia et al., 2013; Mertens et al., 2009a; Wright and Harding, 2012).

La microglía activada produce gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios que incluyen prostaglandinas, citoquinas, quimiocinas, proteinasas, ROS y RNS (McGeer and McGeer, 2004). Una de las citoquinas producida tras la activación microglial es el TNF- $\alpha$ . Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el TNF- $\alpha$  juega un papel muy importante en diferentes procesos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (Fillit et al., 1991); esclerosis múltiple (Hofman et al., 1989) y la EP (Mogi et al., 1994). Además, un estudio realizado por Harms et al. en el 2012 (Harms et al., 2012) sugiere que las neuronas dopaminérgicas son extremadamente vulnerables al TNF- $\alpha$ , lo que está en consonancia con los valores incrementados de TNF- $\alpha$  observados en el fluido cerebroespinal, sangre y muestras tisulares post-mortem de cerebros de pacientes con EP (Scalzo et al., 2009).

Sin embargo, a día de hoy, todavía no se ha estudiado si el TNF- $\alpha$  desempeña un papel importante en el incremento de la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por una hiperactivación de SRA. Por este motivo, nuestros dos primeros objetivos han sido:



## **Objetivos**

### **2.2.2 OBJETIVOS 1 Y 2**

1. Estudiar la posible implicación de la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$  en la degeneración dopaminérgica inducida por AII, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* de la EP.
2. Estudiar los mecanismos implicados en este proceso.

### **2.2.3 Justificación de objetivo 3**

RhoA, miembro de la familia Rho, inicia procesos celulares que actúan en su efector Rock asociado a quinasas (ROCK) (Kato et al., 1998). Se han descrito dos formas diferentes de ROCK: ROCK I y ROCK II (Nakagawa et al., 1996) siendo ROCK II, la forma de expresión más abundante en el cerebro.

En el SNC, se ha descrito una activación anormal de vía RhoA/ROCK en enfermedades que cursan con neuroinflamación tales como lesión de la médula espinal, enfermedades desmielinizantes inflamatorias, modelos de isquemia, enfermedad de Alzheimer y EP (Herskowitz et al., 2013; Sheikh et al., 2009; Villar-Cheda et al., 2012a). Estudios recientes demuestran que la activación de la vía RhoA/ROCK está involucrada en la degeneración celular dopaminérgica inducida por MPTP y que ésta se ve reducida tras la administración de inhibidores de ROCK (Tönges et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012a). Los efectos neuroprotectores han sido atribuidos a la inhibición de la respuesta microglial inducida por neurotoxinas (Villar-Cheda et al., 2012a) o a efectos protectores directamente sobre axones estriatales dopaminérgicos (Tönges et al., 2012). Sin embargo, el mecanismo responsable del incremento de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas todavía se desconoce. Esta importante cuestión ha de ser clarificada para conseguir un conocimiento más profundo de los mecanismos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Además, actualmente se están sugiriendo como alternativas terapéuticas en el tratamiento de la EP fármacos cuyo mecanismo de acción se fundamenta en la inhibición de ROCK (Labandeira-Garcia et al., 2014).

### **2.2.4 OBJETIVO 3**

Por todo lo expuesto, nos propusimos:

3. Estudiar el mecanismo neuroprotector de la inhibición de ROCK en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

### **2.2.5 Justificación de objetivos 4 y 5**

La AII, a través de su unión a los receptores AT1, induce un aumento del estrés oxidativo y de la inflamación a través de dos vías principales:

- La AII, al interactuar con los receptores AT1, activa el complejo NADPH-oxidasa, el cual media aspectos clave del estrés oxidativo y la inflamación (Joglar et al., 2009; Muñoz et al., 2006; Rey et al., 2007; Rodríguez-Pallares et al., 2008). Además, se ha demostrado que la activación microglial y la generación de radicales libres derivados de la activación del complejo NADPH son factores determinantes en los efectos de las neurotoxinas dopaminérgicas y posiblemente en EP (Peterson and Flood, 2012; Qin et al., 2013; Rodríguez-Pallares et al., 2007; Wu et al., 2003).
- Otra vía responsable de la degeneración dopaminérgica inducida por AII es la vía RhoA/ROCK que ejerce una importante regulación del citoesqueleto de actina lo cual es particularmente importante para la migración de las células inflamatorias, incluyendo microglía (Barcia et al., 2012; Yan et al., 2012), a áreas inflamadas y fenómenos de fagocitosis (Greenwood et al., 2003; Honing et al., 2004). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la activación de ROCK microglial es un factor determinante en la muerte celular dopaminérgica inducida por AII en modelos de EP.

No obstante, la relación precisa entre RhoA/ROCK y NADPH-oxidasa todavía no ha sido estudiada. Dicha relación, de existir, sería de gran importancia en el conocimiento de los mecanismos implicados en la progresión de la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas ya que podría significar el mecanismo común de enlace que relaciona los componentes principales de la respuesta microglial: cambios en la movilidad microglial y fagocitosis, generación de superóxido y liberación de citoquinas inflamatorias.

### **2.2.6 OBJETIVOS 4 y 5**

Es por todo lo expuesto que los **OBJETIVOS 4 y 5** de la presente tesis doctoral se centraron en:

4. Estudio de la posible interacción entre la vía RhoA/ROCK y la activación del complejo NADPH-oxidasa.
5. Estudio de los posibles mecanismos involucrados en dicha interacción.





# **MATERIALES Y MÉTODOS**



Los materiales y métodos empleados en cada uno de los experimentos realizados, así como el diseño experimental de los mismos, se encuentran detallados en cada uno de los artículos que integran la presente tesis doctoral. No obstante, a continuación, se realiza un breve resumen de los mismos.

### **3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

#### **3.1.1 El TNF- $\alpha$ microglial media el incremento de la degeneración dopaminérgica inducido por la angiotensina cerebral.**

Para evaluar el papel de TNF- $\alpha$  en el aumento de la respuesta microglial y en la neurodegeneración dopaminérgica inducida por una hiperactivación del SRA cerebral se utilizaron modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de la EP.

En una primera serie de experimentos, y con el fin de estudiar los efectos de la AII en el incremento de los niveles de TNF- $\alpha$ , se trataron cultivos primarios mesenfálicos (cultivos con neuronas y población glial) con diferentes dosis de AII. En una segunda serie de experimentos se usaron cultivos primarios para estudiar la implicación del TNF- $\alpha$  en la pérdida celular dopaminérgica inducida por la neurotoxina MPP<sup>+</sup> y AII.

Con el fin de identificar las células y mecanismos implicados en la producción de TNF- $\alpha$  inducida por AII se usaron cultivos primarios, cultivos de la línea microglial murina N9 y cultivos de la línea celular dopaminérgica MES 23.5. Estos cultivos se trataron con AII; o con el agonista del receptor de AT1, L-162313; o con el agonista del receptor AT2, CGP-421121A; o con AII y el antagonista del receptor AT1, ZD-7155; o con AII y el antagonista del receptor AT2, PD-123319; o con ZD-7155 solo o con PD-123319 solo; o con AII y el inhibidor de NADPH, apocinina; o con AII e inhibidores de NF- $\kappa$ B, Pirrolidinditiocarbamato de amonio (PDTC) o sulfasalazina (SS); o con AII+PDTC+ZD-7155; o con AII+PDTC+ PD-123319; o con AII+SS+ ZD-7155; o con AII + SS+ PD-123319; o con el inhibidor de Rho quinasa, Y-27632. Además, la línea celular dopaminérgica MES 23.5 fue tratada con MPP<sup>+</sup>, MPP<sup>+</sup> y TNF- $\alpha$ ; o MPP<sup>+</sup> y TNF- $\alpha$  y PDTC o TNF- $\alpha$  sólo.

Para los estudios *in vivo* se usaron ratones macho de la cepa C57BL/6J tratados con la neurotoxina MPTP. Con el fin de estudiar la implicación de los receptores AT1 y de NF- $\kappa$ B en

## ***Materiales y métodos***

la degeneración dopaminérgica inducida por MPTP se establecieron 4 grupos experimentales: (1) grupo control, que no recibió ningún tratamiento; (2) grupo MPTP, que recibió una sola inyección intraperitoneal de la neurotoxina; (3) un tercer grupo de animales fue tratado con MPTP, y el antagonista del receptor AT<sub>1</sub>, candesartán, y; (4) un cuarto grupo fue tratado con MPTP y PDTC.

### **3.1.2 La inhibición de la respuesta microglial es esencial para los efectos neuroprotectores de los inhibidores de Rho-quinasa en la muerte dopaminérgica inducida por MPTP**

En este trabajo se abordó el estudio del mecanismo neuroprotector de la inhibición de ROCK en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Para ello, se trataron con la neurotoxina MPP<sup>+</sup> y/o el inhibidor de ROCK, Y-27632, cultivos primarios (neuronas y población glial), cultivos de la línea dopaminérgica MES 23.5 y cultivos primarios mesencefálicos carentes de células microgliales (tratados con L-leucina metil éster, LME).

### **3.1.3 Interacción entre el complejo NADPH-oxidasa y Rho-quinasa en la activación microglial inducida por la AII.**

Para estudiar la interacción entre la activación de NADPH-oxidasa mediada por AII y la vía RhoA/ROCK, se trataron ratas jóvenes con AII; AII más el inhibidor de ROCK, Fasudil; y AII más el inhibidor del complejo NADPH-oxidasa, Apocinina. Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo exponiendo cultivos de la línea microglial murina N9 o cultivos primarios de microglía a AII sola; AII más un segundo inhibidor de ROCK, Y-27632; o AII más apocinina. El estudio de la implicación de los superóxidos, derivados de la activación por AII, en la activación de la vía RhoA/ROCK, se realizó pretratando los cultivos con el agente antioxidante, N-acetilcisteína (NAC). Para determinar el papel de NF- $\kappa$ B en la activación de la vía RhoA/ROCK mediado por AII, los cultivos se trataron con el inhibidor de NF- $\kappa$ B, PDTC. Finalmente, se empleó el SB-203580, inhibidor de p38 quinasa activada por mitógenos, para estudiar la implicación de ésta en el incremento de la actividad del complejo NADPH-oxidasa mediada por AII.

### 3.2 MODELOS ANIMALES

Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo de acuerdo con al Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, *por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*, transposición de la Directiva europea 2010/63/EU y fueron aprobados por el correspondiente comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela.

En las tablas siguientes se resumen los modelos animales (Tabla 1) y los tratamientos administrados y/o las lesiones provocadas (Tabla 2).

**Especies y edades de animales usados (Tabla 1)**

ANIMAL	CEPA O ESPECIE	EDAD y SEXO
RATÓN	C57BL-6J	8-10 semanas; macho
RATA	Sprague-Dawley	10 semanas (Jóven); macho

**Tratamientos empleados *in vivo* (Tabla 2)**

Tratamiento	Régimen administración	Actividad	Referencia y casa comercial
AII, Angiotensina	5µg/3µL intraventricular dosis única.	Efactor de SRA.	A9525, Sigma Aldrich
Apocinina	5 mg/kg intraperitoneal Dosis única.	Inhibidor del complejo NADPH-oxidasa	55539 Fluka, Buchs, Sigma Aldrich
Candesartán	1 mg/kg/día oral 2 semanas (+1 ó 3 días)	Antagonista del receptor AT1	Atacand® comprimidos AstraZeneca
Fasudil	30 mg/kg/día oral 1 semana (+1 ó 3 días)	Inhibidor de ROCK	F-4660, LC laboratories
MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina )	30 mg/kg/día intraperitoneal	Neurotoxina dopaminérgica	M0896, Sigma Aldrich
PDTC (Pirrolidinditiocarbamato de amonio)	150 mg/kg/día oral 2 semanas (+1 ó 3 días)	Inhibidor del complejo proteico NF-κβ	P8765, Sigma Aldrich



### **3.3 MODELOS CELULARES**

#### **3.3.1 Cultivos primarios mesencefálicos.**

Para la obtención de cultivos primarios mesencefálicos, el tejido procedente de la porción ventral mesencefálica del cerebro fue diseccionado a partir de embriones de rata de Sprague-Dawley de 14 días de gestación. Los embriones se extrajeron por cesárea con la madre profundamente anestesiada. El tejido se incubó rápidamente en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) con un 0,05% de DNasa (Sigma) y 0,1% de tripsina (Sigma), durante 20 minutos en un baño termostático a 37°C. Después se le hicieron varios lavados con DNasa/DMEM y fue mecánicamente dissociado y centrifugado a 50g durante 5 minutos, tras lo cual el sobrenadante fue minuciosamente retirado y el pellet resuspendido en el volumen final requerido en 0,05% de DNasa/DMEM. A continuación, se realizó la estimación del número de células viables en la suspensión usando una tinción con naranja de acridina (Sigma) y bromuro de etidio (Sigma) observando la muestra al microscopio de fluorescencia.

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 35 mm (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) previamente tratadas con poli-L-lisina (100 µg/ml; Sigma) y laminina (4 µg/ml; Sigma) a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml de medio de cultivo y mantenido bajo condiciones control [(DMEM/F12 (F-12 Nutrient Mixture (Ham)) (1:1)] y suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*)]. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C durante 8 días *in vitro* (DIV); dos días después, se reemplazó el medio por uno fresco. Los distintos tratamientos se realizaron entre los días 4 y 6 DIV en función del diseño experimental (Tabla 3). Las células tratadas fueron comparadas siempre con sus respectivos controles. Los cultivos fueron mantenidos durante 7 ó 8 días *in vitro* (DIV), tras los cuales las células fueron teñidas para distintos marcadores y/o procesadas inmunohistoquímicamente o utilizadas para estudios de RT-PCR a tiempo real (apartado 3.6) o Western Blot (WB) (apartado 3.5).

#### **3.3.2 Cultivos primarios mesencefálicos carentes de microglía.**

Para la obtención de cultivos primarios mesencefálicos carentes de microglía, se trataron las células 48 horas después de la siembra con LME; 1,5 mM; Sigma. El LME se mantuvo durante 72 horas en el cultivo para conseguir eliminación de la microglía. Este

procedimiento ha sido descrito por Gao et al. en 2008 (Gao et al., 2008); después el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco para realizar posteriormente los correspondientes tratamientos. Este método nos permite enriquecer el cultivo astroneuronal hasta en un 97% de pureza.

### **3.3.3 Cultivos primarios enriquecidos en microglía**

Los cultivos primarios microgliales se prepararon a partir de cerebros de neonatos de rata de Sprague-Dawley de un día de edad. El tejido cerebral, desprovisto de meninges, fue disociado mecánicamente y las células aisladas se sembraron en flasks de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (BD Falcon,  $2.5 \times 10^7$  células/flask) en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y el medio fue reemplazado 4 días después del sembrado inicial. Una vez confluyente (12-14 días), la microglía fue separada de astrocitos por la agitación de los flasks durante 5 horas a 180 rpm a 37°C. La microglía enriquecida se recogió entonces por centrifugación y se sembró en placas de 35 mm a una densidad de 10<sup>6</sup> células/ml con DMEM suplementado con 10% de FBS. Después de una hora a 37°C, el medio se cambió para retirar las células no adheridas y los cultivos se mantuvieron durante 24 horas en las mismas condiciones. La pureza de los cultivos enriquecidos de microglía se evaluó por inmunohistoquímica para un marcador específico de microglía, receptor de complemento CR3, detectado por el anticuerpo OX-42, GFAP como marcador específico para astrocitos y anti-NeuN como marcador neuronal y fue prácticamente del 100%.

### **3.3.4 Línea dopaminérgica MES 23.5.**

La línea dopaminérgica MES 23.5 fue cedida por el Dr. Wei-dong Le (Baylor College of Medicine, TX, USA). Se cultivó en un medio compuesto por DMEM y F12 (Ham), y suplementado con el medio de crecimiento Sato además de FBS al 2%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml a 37°C en un incubador humidificado de CO<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire) (Crawford et al., 1992). Para su uso en experimentos, las células fueron sembradas a una densidad de  $0.5 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm previamente tratadas con poli-L-ornitina (P-4638, Sigma; 10 mg/ml) con o sin cubreobjetos de vidrio. Las células se estimularon para

### ***Materiales y métodos***

aumentar la diferenciación y la actividad TH con dibutiril-Camp (D0627, Sigma; 1 mM). Fueron utilizadas al 80% de confluencia para cualquier tratamiento.

#### **3.3.5 Línea microglial N9**

La línea microglial murina N9 fue cedida por la Dra. Paola Ricciardi Castagnoli (Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology and Research (A\*STAR), Singapore, Singapore). Las células N9 se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640; Invitrogen, 21875-091), suplementado con FBS al 5%, 2 mM de L-Glutamina (Sigma, G6392) y antibióticos (penicilina y estreptomicina). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en un incubador humidificado con aporte de CO<sub>2</sub> al 5% (Righi et al., 1989). Finalmente, las células fueron sembradas a una densidad de 0.5x10<sup>6</sup> células/ml de medio en placas de 35 mm.

#### **Tratamientos empleados *in vitro* (Tabla 3)**

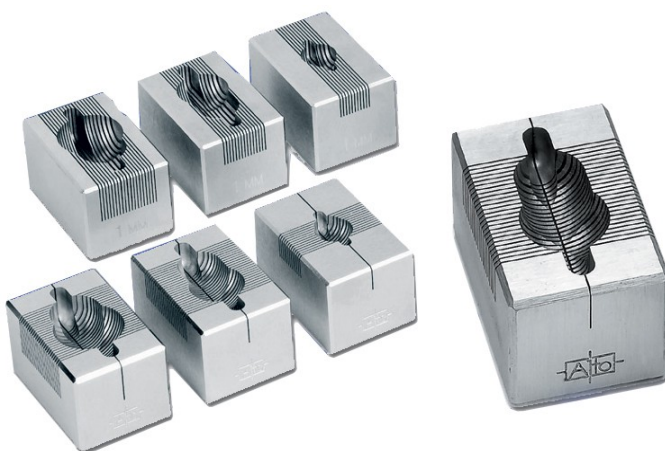
<b>Tratamiento</b>	<b>Régimen de administración</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencia y casa comercial</b>
<b>Angiotensina</b>	(1, 10, 50, 100 o 150) nM, dosis única	Efector de SRA	A9525, Sigma Aldrich
<b>Apocinina (4'-hidroxi-3'-metoxiacetofenona 4')</b>	1mM, dosis única	Inhibidor del complejo NADPH-oxidasa	55539 Fluka, Buchs, Sigma Aldrich
<b>CGP-42112</b>	200 nM, dosis única	Agonista de los receptores AT2	C160, Sigma Aldrich
<b>L-162,313</b>	1 µM, dosis única	Agonista de los receptores AT1	L1415, Sigma Aldrich
<b>LME (L-leucina-metil-ester)</b>	1,5 mM, dosis única	Inhibidor de la replicación de la población microglial	L1002, Sigma Aldrich
<b>MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridina)</b>	(0,25, 10 o 20) µM, dosis única	Neurotoxina dopaminérgica	D048, Sigma Aldrich
<b>N-acetil cisteína (NAC)</b>	0,5 mM, dosis única	Compuesto antioxidante	A9165, Sigma Aldrich
<b>PD 123,319 (sal hidratada de di (trifluoroacetato))</b>	1 µM, dosis única	Antagonista de los receptores AT2	P186, Sigma Aldrich
<b>PDTC (Pirrolidinditiocarbamato de amonio)</b>	50 µM, dosis única	Inhibidor del complejo proteico NF-κβ	P8765, Sigma Aldrich
<b>SB-203580</b>	20 µM, dosis	Inhibidor de la	S8307, Sigma

	única	quinasa P38 MAPK	Aldrich
<b>Sulfasalazina (SS)</b>	1,25 $\mu$ M, dosis única	Inhibidor del complejo proteico NF- $\kappa$ B	S0883, Fluka, Sigma Aldrich
<b>TAPI (TAPI-2 sal de acetato)</b>	50 $\mu$ M, dosis única	Inhibidor del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	SML0420, Sigma Aldrich
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	40 ng/ml	Factor de necrosis tumoral $\alpha$	T6674, Sigma Aldrich
<b>Y-27632 dihidrocloruro</b>	30 $\mu$ M, dosis única	Inhibidor del enzima ROCK	Y0503, Sigma Aldrich
<b>ZD 7155 (ZD 7155 clorhidrato)</b>	1 $\mu$ M, dosis única	Antagonista de los receptores AT1	Cat n°1211, Tocris

### 3.4 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

#### 3.4.1 Procesado de tejido cerebral.

Para la obtención de las regiones de SN y de estriado de los cerebros de rata o ratón, éstos se retiraron rápidamente del cráneo, una vez sacrificado el animal, y se colocaron en una matriz de acero inoxidable para rata o ratón (en función de la especie usada en el experimento) (Stoelting Co). Con ayuda de un cortador de tejido ajustado a 1 mm de grosor se aisló el mesencéfalo según las coordenadas de Paxinos y Watson, (Paxinos and Watson, 1986). A continuación, las porciones de tejido para la obtención de SN y estriado fueron diseccionadas cuidadosamente en una placa de vidrio previamente enfriada utilizando un microscopio estereoscópico (Leica M220). Posteriormente, las muestras se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento para las técnicas de WB, determinación de niveles de TNF- $\alpha$  y de determinación de las actividades de NADPH oxidasa y de Rho-quinasa.



**Figura 6. Matrices de acero inoxidable para cerebros de rata y de ratón.**

### **3.4.2 Determinación de los niveles de TNF- $\alpha$**

Las células en cultivo (cultivos mesencefálicos primarios y líneas celulares MES 23.5 y N9) y tejido correspondiente a la zona del estriado y mesencéfalo ventral de ratones o ratas se homogeneizaron en tampón RIPA (del inglés, *Radio Immunoprecipitation Assay*) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (P8340, Sigma) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*), (P7626, Sigma). Los homogeneizados fueron centrifugados, a 12.000 g durante 20 min a 4 °C, y las concentraciones de proteína se determinaron por el método de Bradford. Los niveles de TNF- $\alpha$  de muestras de ratones o ratas se cuantificaron con un kit de ELISA específico (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (TNF- $\alpha$  de rata, Diaclone, 865.000.192; TNF- $\alpha$  de ratón, Diaclone, 860.040.192). Los resultados de la cuantificación de TNF- $\alpha$ , tanto en las muestras de cerebro como de cultivos, se obtuvieron en pg/ml de proteína y fueron expresadas en porcentaje con respecto a las muestras de los grupos control.

### **3.4.3 Determinación de la actividad NADPH oxidasa y Rho-quinasa.**

#### **ACTIVIDAD DEL COMPLEJO NADPH-OXIDASA**

La actividad del complejo NADPH-oxidasa se midió por quimioluminiscencia con lucigenina en un lector de placas multipocillos, Infinite M200 (TECAN), como está descrito por Griendling et al. (2000) y Hong et al. (2006). La quimioluminiscencia fue expresada como unidades relativas de luz por minuto y por miligramo de proteína (RLU/min/mg protein). El nivel de activación del complejo NADPH-oxidasa se confirmó mediante la determinación de la expresión de p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> (véase posteriormente). El complejo NADPH-oxidasa se compone de subunidades unidas a membrana y subunidades citosólicas, como p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> (Li and Shah, 2003) cuya translocación es necesaria para la activación del complejo NADPH-oxidasa, que a su vez genera ROS. El nivel de las subunidades p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> se correlaciona con la actividad del complejo NADPH-oxidasa y la formación de superóxidos derivados de ésta (Rueckschloss et al., 2002; Touyz et al., 2002).

#### **ACTIVIDAD RHO-QUINASA**

La actividad Rho-quinasa (ROCK) fue medida con un kit de ensayo (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones de uso indicadas por el fabricante. El kit consiste en un inmunoensayo enzimático desarrollado para la detección específica de la fosforilación realizada por ROCK a nivel de la subunidad 1 de la fosfatasa de miosina en el residuo Thr696. Las células y el tejido se homogeneizaron en tampón de lisis (50 mM Tris-ácido clorhídrico pH 7,5, cloruro sódico 150 mM, 1 mM 2-glicerofosfato, 1% de Triton X-100, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*) 1 mM, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA, del inglés *ethylene glycol tetraacetic acid*) 1 mM, y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) que incluye un cóctel de inhibidor de proteasas (P8340; Sigma). La concentración proteica fue medida usando el kit de ensayo de proteína *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) y se utilizaron cantidades iguales de proteína (5 mg por pocillo). Cada muestra se analizó por duplicado. La fosforilación se evaluó

## ***Materiales y métodos***

midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas multipocillos, Infinite M200 (TECAN). La activación de ROCK fue confirmada mediante la medida de expresión proteica de RhoA y ROCK II por WB (ver apartado 3.5).

### **3.5 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)**

Las muestras de células y tejido se lisaron en tampón RIPA con inhibidores de proteasas (P8340; Sigma), PMSF (P7626, Sigma) e inhibidores de fosfatasas (P0044, Sigma) para la determinación de la proteína fosforilada map quinasa p-38. El homogenado resultante fue centrifugado a 14.000 g durante 20 minutos. Finalmente, la concentración proteica se determinó en el sobrenadante usando el kit de ensayo de proteína *Pierce BCA Protein Assay kit*.

A continuación, las proteínas fueron separadas en geles de Bis-Tris poliacrilamida al 5-10% en condiciones desnaturizantes y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que fueron previamente bloqueadas con leche desnatada deshidratada al 5% en tampón PBS-Tween, y posteriormente incubadas durante la noche con los anticuerpos primarios de interés (Tabla 4). Después de los lavados pertinentes, se procedió a su incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa de rábano (HRP; del inglés *horseradish peroxidase*) (Tabla 5).

Para visualizar las bandas correspondientes a la inmunoreactividad de los anticuerpos, se utilizó un kit de quimioluminiscencia (170-5044; *Immun-Star HRP*, BioRad) y se capturó la imagen con un sistema de detección de quimioluminiscencia (*Molecular Imager ChemiDoc XRS System*, BioRad).

Como control de carga, todas las membranas fueron reincubadas con un anticuerpo contra la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, del inglés Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; G9545, Sigma) o  $\alpha$ -tubulina (T5168; Sigma) y los resultados de expresión de las proteínas de interés, que se obtuvieron por medida densitométrica de las bandas, fueron normalizados, expresándolos de forma relativa con respecto a la banda de la GAPDH o tubulina. Finalmente, los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).



Figura 7. Dispositivos empleados para llevar a cabo la técnica.

Anticuerpos primarios para WB (Tabla 4).

Antígeno (concentración)	Especie	Tipo	Referencia y casa comercial
Arginasa (1:1500)	Cabra	Policlonal	ab 60176 Abcam
AT1 (1:200)	Cabra	Policlonal	sc-31181 Santa Cruz Biotechnology
GAPDH (1:25000)	Conejo	Policlonal	G9545 Sigma Aldrich
iNOS 1:1500	Conejo	Policlonal	ab 3523 Abcam
NF- $\kappa$ B p65 (1:200)	Ratón	Monoclonal	sc-8008 Santa Cruz Biotechnology
p47 phox (1:200)	Cabra	Policlonal	sc-7660 Santa Cruz Biotechnology
p67 phox (1:200)	Cabra	Policlonal	sc-7663 Santa Cruz Biotechnology
Fosfo p38 MAPK (1:1000)	Ratón	Monoclonal	9216S Cell Signaling Technology
RhoA (1:200)	Conejo	Policlonal	sc-179 Santa Cruz Biotechnology
Rock II (1:200)	Cabra	Policlonal	sc-1851 Santa Cruz Biotechnology
TUBULINA (1:50000)	Ratón	Monoclonal	T5168 Sigma Aldrich



**Anticuerpos secundarios para WB (Tabla 5).**

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Referencia y casa comercial</b>
<b>cabra anti-conejo H &amp; L-HRP (1: 5000)</b>	ab6721 Abcam
<b>IgG burro anti-cabra (1:2500)</b>	sc-2020 Santa Cruz Biotechnology
<b>IgG cabra anti-conejo (1:2500)</b>	sc-2004 Santa Cruz Biotechnology
<b>IgG pollo anti-ratón (1:2500)</b>	sc-2954 Santa Cruz Biotechnology
<b>Proteína A (1:5000)</b>	NA9120V GE Healthcare

### **3.6 PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR)**

El ARN total de la SN o del estriado se extrajo mediante uso del reactivo Trizol (Invitrogen) y según las especificaciones del fabricante. Para obtener el ácido desoxirribonucleico complementario (ADN complementario (cADN)), se partió de 2,5 µg de ARN y se llevó a cabo una retrotranscripción añadiendo en la reacción nucleótidos (dNTP), cebadores y la enzima transcriptasa inversa MMLV (del inglés, *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*). Posteriormente, se amplificaron los genes de interés mediante una PCR a tiempo real (RT-PCR, del inglés *Real Time Polymerase Chain Reaction*). Estos experimentos se realizaron en un termociclador iCycler™ PCR (BioRad). Paralelamente a la amplificación el gen de interés, se amplificó el gen de β-Actina como control, y la expresión de cada gen de interés se expresó en función a este transcrito *housekeeping* (Tabla 6). Para determinar la expresión relativa del ARNm, se utilizó el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl, 2001) y los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM.



**Figura 8.** Dispositivo utilizado para efectuar la técnica de PCR a tiempo real.

**Parejas de primers usados para la técnica de PCR a tiempo real (Tabla 6).**

	Marcador	Especie	Secuencia
<b>F</b>	TNF- $\alpha$	Ratón	5'-CGTGGAAGTGGCAGAAGAG-3'
<b>R</b>		Ratón	5'-ACAAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'
<b>F</b>	B-actina	Ratón	5'-FTCGTGCGTGACATTA AAGAG -3'
<b>R</b>		Ratón	5'-TGCCACAGGATTCCATACC-3'

### 3.7 INMUNOCITOQUÍMICA / INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la técnica de inmunocitoquímica, los cultivos celulares, primarios o procedentes de las líneas dopaminérgica, MES 23.5, y microglial, N9, fueron fijados con paraformaldehído al 4% en tampón salino-fosfato Dulbecco (DPBS, *del inglés Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) (pH 7,4) durante 20 min, y la actividad de peroxidasa endógena fue inactivada mediante la incubación durante 5 min con una solución al 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en

## ***Materiales y métodos***

DPBS. Posteriormente se preincubaron en DPBS con un 10% de suero normal (de la misma especie que el anticuerpo secundario, para evitar uniones inespecíficas), 1% de suero de albúmina bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) y 0,3% de Triton X-100 (Sigma) (para permeabilizar la membrana celular) durante 1 h. A continuación, se incubaron a 4°C con los anticuerpos primarios pertinentes (Tabla 7) y su suero correspondiente. Seguidamente, se incubaron, durante 1 hora, con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón (1: 500; Vector, Burlingame, CA). Después, los cultivos fueron incubados durante 1 hora con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (1: 500; Vector) y se revelaron con 0,04% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0,05% de 3,3'-diaminobencidina (Sigma) como cromógeno.

En la técnica de inmunofluorescencia, se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos (Alexa Fluor 488; IgG burro anti-ratón (A10042; Life Technologies; 1:200). Los núcleos fueron contrastados con Hoechst 33342. Posteriormente, los cultivos se montaron y se visualizaron con un microscopio invertido Nikon Eclipse (TE300).

**Anticuerpos primarios para técnicas inmunocitoquímicas/inmunohistoquímicas (Tabla 7).**

<b>Antígeno (concentración)</b>	<b>Especie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Referencia y casa comercial</b>
<b>CD11b (1:1000)</b>	Ratón	Monoclonal	CA275R Serotec , Kidlington , Oxford, UK
<b>GFAP (1:1000)</b>	Ratón	Monoclonal	MAB360 Chemicon , Kidlington , Oxford, UK
<b>NeuN (1:2000)</b>	Ratón	Monoclonal	MAB377 Chemicon, Temecula, CA
<b>OX-42 (1:1000)</b>	Ratón	Monoclonal	MCA275XZ Serotec , Kidlington , Oxford, UK
<b>TH (1:30000)</b>	Ratón	Monoclonal	T2928 Sigma Aldrich

### **3.8 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO Y MEDIDA DE LONGITUDES DE NEURITAS**

Las células en cultivo marcadas inmunohistoquímicamente para TH (1:30000; Sigma) fueron cuantificadas usando un microscopio invertido de contraste de fases (Eclipse, Nikon) a 100 aumentos. Se estimó el número de células en cinco campos microscópicos (0,5 x 0,5cm)

elegidos aleatoriamente a lo largo de la placa de cultivo. Las células marcadas por inmunofluorescencia fueron cuantificadas empleando un microscopio acoplado a una fuente de epi-fluorescencia.

Los resultados fueron obtenidos de al menos 3 experimentos independientes (cultivos obtenidos por separado) con un tamaño mínimo de muestra de 4 placas por grupo. Estos resultados fueron normalizados comparando los contajes de los grupos experimentales con los del grupo control de la misma tanda, expresando así los resultados como porcentaje de células positivas respecto al grupo control para contrarrestar la posible variabilidad entre tandas.

Para la medición de las longitudes de las neuritas se utilizó el software de análisis de imagen Image J (NIH-Image 1.46a) y se seleccionaron al azar las neuronas de los grupos de control y grupos tratados con MPP<sup>+</sup> y/o Y- 27632. Se midieron un mínimo de 75 procesos de tres experimentos independientes por grupo de tratamiento, excluyéndose aquellos conjuntos de células en las que los cultivos primarios no estaban claramente diferenciados. La longitud de una neurita se definió como la distancia desde el soma hasta la punta de la rama más larga (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2004).

### **3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos fueron expresados como media  $\pm$  error estándar (SEM). Las comparaciones entre dos grupos se realizaron con el test de t-Student, mientras que para las comparaciones múltiples se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Bonferroni o del test de Holm-Sidak, dependiendo del estudio. Se consideró la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ , y la normalidad de las poblaciones y la homogeneidad de las varianzas fue testada antes de cada análisis de datos. Los programas utilizados para todos los análisis estadísticos y la elaboración de los histogramas fueron SigmaStat 3.0.1 y SigmaPlot 8.0.2 (Jandel Scientific).





## **RESULTADOS**



#### 4.1 EL TNF $\alpha$ MICROGLIAL MEDIA EL INCREMENTO DE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA INDUCIDO POR LA ANGIOTENSINA CEREBRAL

**Borrajo A**, Rodríguez-Pérez AI, Díaz-Ruiz C, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014) *Microglial TNF- $\alpha$  mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin*. *Glia*, 62(1):145-57. doi: 10.1002/glia.22595. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24272709>

Estudios previos han demostrado que la hiperactivación del SRA cerebral local incrementa la respuesta microglial inflamatoria, el estrés oxidativo y la degeneración dopaminérgica. La microglía activada produce gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios entre los que se encuentra la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$ .

En este primer trabajo se estudió la implicación del TNF- $\alpha$  microglial en la degeneración dopaminérgica inducida por la hiperactivación del SRA cerebral.

El tratamiento de cultivos primarios mesencefálicos con dosis bajas de la neurotoxina MPP<sup>+</sup> indujo una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas, que fue aumentada por el cotratamiento con AII e inhibida por el cotratamiento con el agente inhibidor de TNF- $\alpha$ , TAPI. También se observó que el tratamiento de los cultivos primarios con AII inducía un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$ , incremento que era revertido tras la administración del agente bloqueante de los receptores AT1, ZD-7155, así como por el empleo del inhibidor del complejo NADPH-oxidasa, Apocinina y por inhibidores de NF- $\kappa\beta$ , PDTC y SS. Sin embargo, los niveles de TNF- $\alpha$  no se vieron afectados en ausencia de microglía. También se probó que la inhibición de vía RhoA/ROCK disminuía los incrementos en los niveles de TNF- $\alpha$  inducidos por AII. Finalmente, el tratamiento de la línea dopaminérgica con TNF- $\alpha$  reveló que la activación de NF- $\kappa\beta$  media los efectos nocivos que, sobre las neuronas dopaminérgicas, ejerce el TNF- $\alpha$  de origen microglial. A continuación, se realizaron estudios *in vivo* que confirmaron que la administración de MPTP a ratones también incrementaba los niveles de TNF- $\alpha$  a nivel de la SN y del estriado y que estos incrementos se revertían tras la administración de agentes bloqueantes de los receptores de AII, AT1 e inhibidores de NF- $\kappa\beta$ .

Los resultados obtenidos demuestran, por primera vez, que el TNF- $\alpha$  tiene un papel determinante en la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida por AII y que la liberación microglial de TNF- $\alpha$  está mediada por la activación de receptores AT1, del complejo NADPH-oxidasa y de NF- $\kappa\beta$ .





#### **4.2 LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA MICROGLIAL ES ESENCIAL PARA LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DE LOS INHIBIDORES DE RHO-QUINASA EN LA MUERTE DOPAMINÉRGICA INDUCIDA POR MPTP**

**Borrajo A,** Rodriguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014) *Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death.* Neuropharmacology, 85:1-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878243>

En estudios recientes se ha demostrado que la activación de vía RhoA/Rho-asociada a quinasa (ROCK) está implicada en la degeneración de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP y probablemente en la progresión de la EP. Es por ello, que se han propuesto como posibles alternativas terapéuticas para el tratamiento de la EP fármacos cuyo mecanismo de acción se centra en la inhibición de ROCK. Sin embargo, los mecanismos responsables del incremento de supervivencia de las neuronas dopaminérgicas tras el tratamiento con dichas moléculas todavía no han sido dilucidados. El presente trabajo se centra en el estudio del mecanismo neuroprotector de la inhibición de ROCK en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

Los resultados obtenidos mostraron que en cultivos primarios tratados simultáneamente con la neurotoxina MPP<sup>+</sup> y con el inhibidor de ROCK Y-27632, se redujo de forma estadísticamente significativa la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, en ausencia de microglía, el tratamiento con el inhibidor no mostró efectividad en la reducción de la pérdida de células dopaminérgicas. Además, el tratamiento con el inhibidor indujo un descenso estadísticamente significativo en la retracción axonal en cultivos primarios (con y sin población microglial) y en cultivos de la línea neuronal dopaminérgica MES 23.5.

Estos resultados nos indican que los inhibidores de ROCK son neuroprotectores frente a la pérdida de células dopaminérgicas inducida por MPP<sup>+</sup> y que la inhibición microglial de ROCK es un mecanismo esencial en dicha neuroprotección. Además, la inhibición de ROCK induce un efecto directo contra la retracción axonal en las células dopaminérgicas supervivientes tras el tratamiento con MPP<sup>+</sup> que, sin embargo, no demuestra ser suficiente para incrementar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas tras el tratamiento con MPP<sup>+</sup>.



### 4.3 INTERACCIÓN ENTRE EL COMPLEJO NADPH-OXIDASA Y ROCK-QUINASA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL INDUCIDA POR ANGIOTENSINA

Rodriguez-Perez AI, Borrajo A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2015) *Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation*. *Glia*, 63(3):466-82. doi: 10.1002/glia.22765.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25377425>

Estudios previos han demostrado que el SRA cerebral, vía receptores AT1, juega un papel determinante en la regulación de la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la progresión de la degeneración dopaminérgica. La activación microglial del complejo NADPH-oxidasa y de la vía RhoA/ROCK son especialmente relevantes en este ámbito. Sin embargo, a día de hoy se desconoce la interrelación precisa entre RhoA/ROCK y el complejo NADPH-oxidasa y si ésta conduce a la activación microglial.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran que, en la SN de ratas, la activación del complejo NADPH-oxidasa está implicada en la activación de la vía RhoA/ROCK, y que ésta, a su vez, también está implicada en la activación del complejo NADPH-oxidasa. También se observó que la AII en la SN induce la expresión de marcadores del fenotipo microglial M1, expresión que se ve bloqueada tras la inhibición del complejo NADPH-oxidasa y de la vía RhoA/ROCK.

En la línea microglial N9 y en cultivos primarios de microglía también existe una retroalimentación positiva entre la activación del complejo NADPH-oxidasa y la vía RhoA/ROCK. La activación, mediada por AII, del complejo NADPH-oxidasa y la formación de superóxido provoca una translocación de NF- $\kappa$ B y la activación de la vía RhoA/ROCK. Dicha activación está, a su vez, implicada en la regulación de la activación del complejo NADPH-oxidasa vía proteinquinasa p38 activada por mitógenos. Además, la activación de ROCK, vía NF- $\kappa$ B, regula al alza la expresión del receptor AT1 en células microgliales.

Las vías NADPH-oxidasa y RhoA/ROCK son responsables de los principales fenómenos que tienen lugar durante la activación microglial: cambios en la movilidad microglial y fagocitosis, generación de superóxido, y liberación de citoquinas inflamatorias. Los resultados obtenidos nos muestran que ambas vías se relacionan a través de un mecanismo común que podría constituir el elemento fundamental de la coordinación de la respuesta microglial (figura 9).

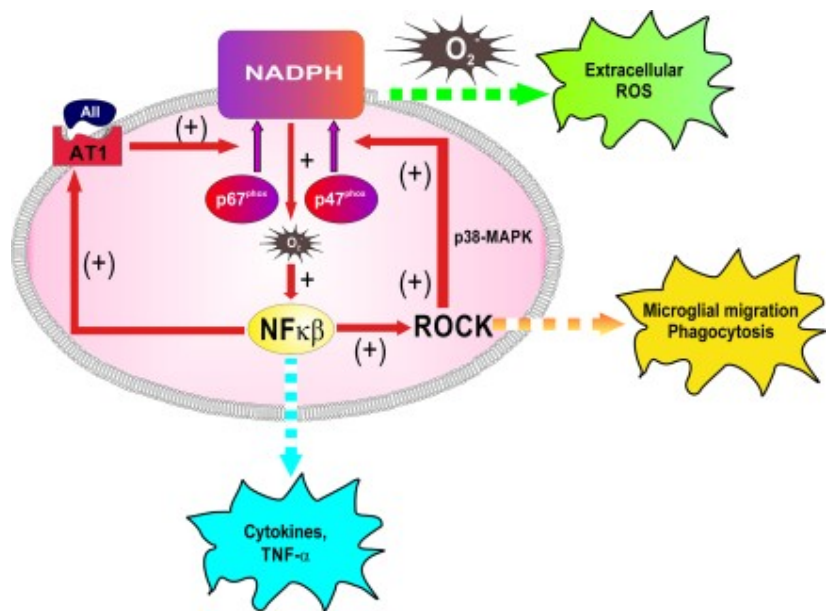


Figura 9. Modelo de la interacción entre el complejo NADPH-oxidasa, Rock-quinasa y NF-κβ en la activación microglial potenciada por AII (Rodríguez-Perez et al., 2015).



## **DISCUSIÓN**



## 5.1 EL TNF- $\alpha$ MICROGLIAL MEDIA EL INCREMENTO DE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA INDUCIDO POR LA ANGIOTENSINA CEREBRAL

Clásicamente se creía que el SRA era un sistema circulante implicado en la regulación de la presión arterial. Sin embargo, muchos tejidos, incluyendo el cerebro, poseen un SRA local (tisular o paracrino), (Ganong, 1994; Re, 2004) que contiene los mismos componentes que el SRA circulante, y que han demostrado un papel más determinante que la AII circulante en la regulación de diversas funciones tisulares y en los procesos degenerativos.

Tanto la SN como el estriado tienen un SRA local (Labandeira-Garcia et al., 2013; Wright and Harding, 2012; Wright et al., 2013). Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación sugieren que factores relacionados con el aumento de la vulnerabilidad dopaminérgica pueden producir una regulación al alza en la función del SRA local, tanto a nivel de las neuronas dopaminérgicas como en la población glial (Rodríguez-Perez et al., 2013a, b; Rodríguez-Perez et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012a; Villar-Cheda et al., 2014; Villar-Cheda et al., 2012b). La sobreactivación del SRA induce, a su vez, la activación complejo NADPH-oxidasas que produce estrés oxidativo y exacerba la respuesta inflamatoria microglial, lo que contribuye a la progresión de la pérdida neuronal dopaminérgica (Labandeira-Garcia et al., 2012; Labandeira-Garcia et al., 2013) (**figura 10**).

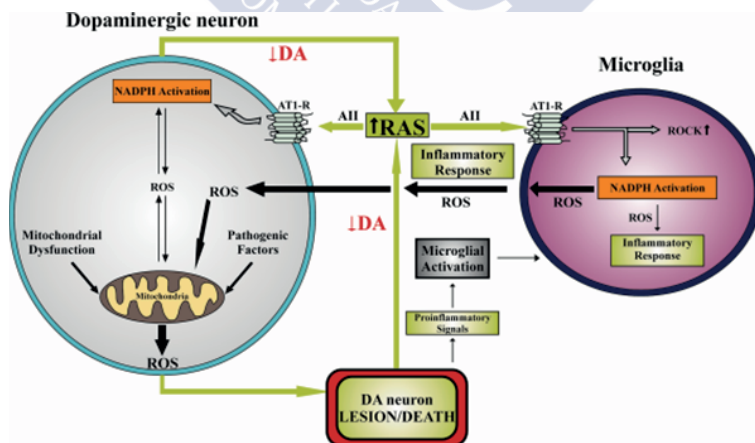


Figura 10. Modelo de la relación del SRA local y la degeneración dopaminérgica. Tomado de Labandeira-Garcia et al., 2013.



El complejo NADPH-oxidasa es una enzima multicomponente que consta de, al menos, dos proteínas de membrana (gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>) y tres proteínas citosólicas (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y Rac). Tras un estímulo adecuado, por ejemplo tratamiento con AII, el complejo NADPH-oxidasa se activa por la translocación de los componentes citosólicos a la membrana plasmática y se produce superóxido (Babior, 1999).

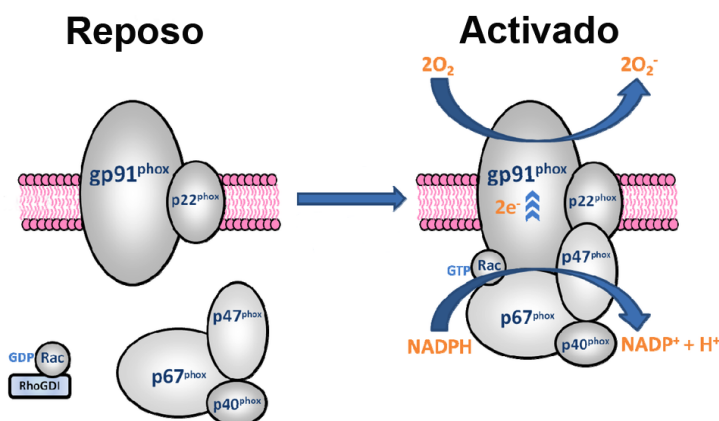


Figura 11. Esquema del mecanismo de activación del complejo NADPH-oxidasa. Modificada de McCann and Roulston, 2013.

Se han encontrado receptores de AII y del complejo NADPH-oxidasa en neuronas dopaminérgicas y células gliales de roedores (Grammatopoulos et al., 2007; Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008) y primates (Garrido-Gil et al., 2013) lo que es indicativo de que la activación del complejo NADPH-oxidasa inducida por AII se puede producir en neuronas y/o células gliales (**figura 11**).

Los experimentos con cultivos enriquecidos en neuronas y carentes de células gliales mostraron que la activación microglial y la formación de superóxidos derivados de la activación del complejo NADPH-oxidasa microglial (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008), junto con la activación de vía RhoA/ROCK microglial (Rodríguez-Perez et al., 2013a; Villar-Cheda et al., 2012a), son esenciales para el incremento de la muerte neuronal inducida por AII en modelos de EP. En consonancia con ello, el tratamiento con inhibidores de NADPH o ROCK ha demostrado efectos neuroprotectores en modelos de EP (Ghosh et al., 2012; Tönges et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012a; Villar-Cheda et al., 2012b) y un

marcado descenso en la degeneración dopaminérgica inducida por AII (Rey et al., 2007; Villar-Cheda et al., 2012a).

La microglía activada produce, además, gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios entre los que destaca la citoquina TNF- $\alpha$ . Los resultados del presente trabajo muestran que el TNF- $\alpha$  microglial es un factor determinante en el incremento de la muerte celular dopaminérgica inducida por AII. Al mismo tiempo, demuestran que los receptores AT1 median la liberación microglial de TNF- $\alpha$ , a través del complejo NADPH-oxidasa, la activación ROCK y la translocación NF- $\kappa$ B.

Se sabe que RhoA/ROCK es un importante regulador del citoesqueleto de actina, particularmente importante para la migración de células inflamatorias, incluyendo microglía (Barcia et al., 2013; Yan et al., 2012), hacia zonas inflamadas (Greenwood et al., 2003; Honing et al., 2004). Durante la activación de las células inflamatorias, RhoA/ROCK induce modificaciones en el citoesqueleto que dan lugar a fenómenos de retracción, expansión y cambios en la motilidad celular, todos ellos característicos de activación de células inflamatorias tales como microglía (Bernhart et al., 2010).

El presente estudio desvela, por primera vez, que la activación de la vía RhoA/ROCK inducida por AII participa en la liberación microglial de TNF- $\alpha$ .

Los resultados de los experimentos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que NF- $\kappa$ B media en el aumento de los niveles de TNF- $\alpha$ . Esto es coherente con nuestra observación de que tanto la inhibición del complejo NADPH-oxidasa como de la vía RhoA/ROCK bloquean el aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  inducido por AII. Estudios anteriores en células renales y vasculares han demostrado que tanto los ROS derivados de la activación del complejo NADPH-oxidasa (Han et al., 1999; Pan et al., 2009) como de la activación de la vía RhoA/ROCK (Cui et al., 2006; Kobori et al., 2011) pueden actuar como mensajeros activando a varios factores de transcripción, entre ellos el NF- $\kappa$ B.

Nuestros resultados sugieren que en las células microgliales se produce la siguiente ruta: AII/AT1, NADPH/ROS y activación de ROCK, traslocación de NF- $\kappa$ B y producción de TNF- $\alpha$ .

En cultivos primarios tratados con AII, se demostró que la inhibición simultánea de los receptores de NF- $\kappa$ B y AT1 produce niveles significativamente más bajos de TNF- $\alpha$  que los observados después de la inhibición de NF- $\kappa$ B o receptores AT1 solos. Esto sugiere que AT1

también puede inducir TNF- $\alpha$  por rutas complementarias independientes de NF- $\kappa$ B, o que NF- $\kappa$ B también puede inducir TNF- $\alpha$  por vías complementarias e independientes de AT1.

El tratamiento simultáneo con el inhibidor NF- $\kappa$ B y antagonistas de los receptores AT1 produjo menores niveles de TNF- $\alpha$  que los niveles de control. Se sabe que los cultivos primarios contienen AII endógena y existe un nivel basal de activación en microglía en cultivos. Esto puede inducir niveles basales de TNF- $\alpha$ , que podrían ser reducidos por el tratamiento con inhibidores de NF- $\kappa$ B más antagonistas de los receptores AT1, pero no únicamente con inhibidores de NF- $\kappa$ B ni con inhibidores de receptores AT1 solos.

Nuestros resultados también demuestran que la producción de TNF- $\alpha$  microglial es inducida por la activación de NF- $\kappa$ B microglial. Sin embargo, NF- $\kappa$ B también se ha observado en células no inflamatorias, incluyendo las neuronas (Park and Bowers, 2010), y varios estudios en diferentes tipos de células han demostrado que la activación de TNF- $\alpha$  puede estimular NF- $\kappa$ B (Park and Bowers, 2010; Tarabin and Schwaninger, 2004). Nuestros resultados sugieren que NF- $\kappa$ B neuronal también puede estar involucrado en el proceso degenerativo. El TNF- $\alpha$  de origen microglial (junto con bajas dosis de neurotoxinas tales como MPP<sup>+</sup> u otros daños neuronales) puede inducir la transcripción neuronal de NF- $\kappa$ B (Sen and Packer, 1996), que, a su vez, puede activar genes implicados en la muerte neuronal y promover la activación microglial inducida por células neuronales.

Una gran cantidad de datos de modelos de EP y muestras de pacientes con EP han demostrado que el TNF- $\alpha$  es un mediador clave en procesos neuroinflamatorios, neurotóxicos y neurodegenerativos en la EP (Leal et al., 2013; McCoy et al., 2011). Aunque no se ha demostrado ninguna asociación genética robusta entre el TNF- $\alpha$  y el desarrollo de la EP, varios estudios han revelado polimorfismos genéticos de TNF- $\alpha$  asociados al riesgo de padecer EP (Bialecka et al., 2008; Wu et al., 2007). Por otra parte, se ha observado un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  en el líquido cefalorraquídeo, sangre y muestras tisulares postmortem de cerebros de pacientes con EP (Scalzo et al., 2009; Varani et al., 2010). Los datos de los diferentes modelos experimentales de EP sugieren que las neuronas dopaminérgicas son extremadamente sensibles a TNF- $\alpha$  (McCoy et al., 2011; McGuire et al., 2001; Qin et al., 2007) y que el TNF- $\alpha$  incrementa la degeneración dopaminérgica en los modelos de EP inducidos por 6-OHDA (Harms et al., 2011; Mogi et al., 1999b) y MPTP (Ferber et al., 2004; McGuire et al., 2001; Sriram et al., 2006). *In vitro*, la administración de

TNF- $\alpha$  ha demostrado ser tóxico para las neuronas dopaminérgicas (McGuire et al., 2001; Sriram et al., 2006), lo cual es consistente con los resultados obtenidos presentados en esta tesis. *In vivo*, la mayoría de la información disponible indica que el TNF- $\alpha$  induce cambios degenerativos en las neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, también se han publicado datos contradictorios, lo que probablemente puede ser atribuido a diferentes aspectos de la metodología (Leal et al., 2013). En primer lugar, el daño inducido por la administración de TNF- $\alpha$  puede ser insignificante en comparación con el inducido por la administración de altas dosis de MPTP o 6-OHDA, lo que conduciría a un aumento no significativo en la pérdida de neuronas dopaminérgicas. En segundo lugar, el aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  estriatales o a nivel de la SN puede no ser significativo tras 1-3 semanas después de la inyección de la neurotoxina (es decir, cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas es completa y se analiza la muestra). En el presente estudio, se observó que la inyección de MPTP inducía un incremento en los niveles TNF- $\alpha$  inicialmente (a las 24 h, a nivel del estriado; a las 72 h en la SN) que disminuyó a partir de entonces hasta valores de nivel del control. La activación microglial temprana también se observó después de una única inyección de MPTP en varios estudios anteriores (Joglar et al., 2009; Wu et al., 2003). Esto sugiere que el aumento observado en la activación microglial y en los niveles de TNF- $\alpha$  contribuye a la degeneración dopaminérgica y no es una consecuencia de la muerte de estas células.

Estudios anteriores han demostrado que la administración de una única dosis de MPTP, 30-40 mg kg<sup>-1</sup>, conduce a una baja muerte neuronal (en torno al 10-12%) 7 días después de la inyección, y que en los ratones tratados con dosis más altas de MPTP, tanto en modelos agudos como en modelos subagudos, la fase activa de la degeneración comienza alrededor de 20 horas después de la primera inyección de MPTP, continúa durante los siguientes días y se completa 7 días después de la última inyección (Jackson-Lewis et al., 1995). Esto es consistente con la hipótesis de que el aumento de TNF- $\alpha$  es necesario para ejercer efectos tóxicos sobre las neuronas de la SN (Leal et al., 2013) a largo plazo o crónico (o en tratamientos agudos pero de dosis muy altas).

En el presente estudio, se observó que el antagonista de los receptores de AII AT1, candesartán, inhibe el aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  inducido por MPTP a nivel de la SN y el estriado lo que está en consonancia con estudios previos que han mostrado que el tratamiento crónico con candesartán disminuye la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducido por varias inyecciones de MPTP (Grammatopoulos et al., 2007; Joglar et al., 2009).

En conclusión, los presentes resultados demuestran que existe una interacción funcional importante entre AII y TNF- $\alpha$  y que éste es un mediador importante en la degeneración dopaminérgica inducida por AII.

Nuestros datos contribuyen a obtener un mejor entendimiento de la patogénesis de la EP demostrando que el SRA cerebral modula los niveles de TNF- $\alpha$ , niveles que pueden reducirse con antagonistas de receptores AT1 e inhibidores la vía RhoA/ROCK. Esto es de particular interés debido a que ambos tipos de medicamentos se utilizan actualmente en la práctica clínica para el abordaje de enfermedades vasculares y renales en los que el estrés oxidativo y la inflamación desempeñan un papel importante.

### **5.2 LA INHIBICIÓN MICROGLIAL ES ESENCIAL PARA LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DE LOS INHIBIDORES DE RHO-QUINASA EN LA MUERTE DOPAMINÉRGICA INDUCIDA POR MPTP**

Estudios recientes han demostrado que la activación de ROCK microglial media, al menos, tres componentes principales de respuesta inflamatoria microglial:

- En primer lugar, en células inflamatorias (Greenwood et al., 2003; Honing et al., 2004), incluyendo la microglía (Barcia et al., 2012; Bernhart et al., 2010; Yan et al., 2012), RhoA /ROCK es un importante regulador del citoesqueleto de actina, lo cual es particularmente importante para la migración a zonas inflamadas y para que se produzcan cambios involucrados en la fagocitosis.
- En segundo lugar, los inhibidores de ROCK suprimen la activación del complejo NADPH-oxidasa (Budzyn et al., 2006; Higashi et al., 2003; Moon et al., 2013). En microglía y otras células inflamatorias, el complejo NADPH-oxidasa produce altas concentraciones de ROS que se liberan extracelularmente para eliminar agentes externos o células (Babior, 2004; Ray and Shah, 2005); tras la fagocitosis se produce un aumento brusco en la formación de superóxido, conocida como estallido oxidativo “oxidative burst” que es catalizada por el complejo NADPH-oxidasa de la membrana (Babior, 1999).
- Por último, la inhibición microglial de ROCK bloquea la liberación de citoquinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  (Borrajo et al., 2014b). Consistente con esto, en modelos experimentales de trastornos del SNC en los que la neuroinflamación es un factor

determinante, se ha demostrado una activación anormal de ROCK (Chen et al., 2013; Mueller et al., 2005).

Ante todas estas evidencias se sugiere que la neuroinflamación y la activación microglial tienen un papel importante en la progresión de la degeneración dopaminérgica y por tanto, en la EP (Gerhard et al., 2006; Ouchi et al., 2005; Rodriguez-Pallares et al., 2007).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado un efecto neuroprotector de los inhibidores de ROCK en ratones y cultivos primarios mesencefálicos de rata (neurona-glía) tratados con MPTP/ MPP<sup>+</sup> (Villar-Cheda et al., 2012b). La neuroprotección ha sido atribuida al aumento de la supervivencia de los cuerpos neuronales y a la mejora de la integridad de los axones de la células dopaminérgicas (Tönges et al., 2012). El mecanismo de neuroprotección ha sido atribuido a un aumento de la señalización Akt ya que tras la inhibición de ROCK (mediante tratamiento con fasudil o Y-27632) aumentaron significativamente los niveles de Akt fosforilada (Tönges et al., 2012). El tratamiento con Fasudil y el bloqueo simultáneo de la señalización Akt podrían, por tanto, aclarar esta hipótesis (Wu et al., 2012).

Villar Cheda et al., 2012 demuestra que el tratamiento con MPTP/MPP<sup>+</sup> aumenta la actividad ROCK en ratones y en cultivos primarios mesencefálicos de rata pero, no observa un incremento significativo en la actividad ROCK en cultivos carentes de microglía. Es por ello que se sugirió que la neuroprotección inducida por la inhibición ROCK podría ser debida a los efectos ejercidos sobre la microglía. Investigar esta hipótesis ha sido objeto del presente trabajo.

Nuestros resultados revelan que la inhibición de la actividad ROCK microglial es un factor esencial y determinante en la neuroprotección ejercida por los inhibidores de ROCK frente muerte celular dopaminérgica inducida por MPTP / MPP<sup>+</sup>.

Tanto en presencia como en ausencia de microglía, el tratamiento con el inhibidor de ROCK, Y-27632, permite observar unas neuritas significativamente más largas en las neuronas dopaminérgicas supervivientes lo que sugiere un efecto directo de Y-27632 sobre dichas neuritas, demostrando así que el inhibidor actúa contra el colapso axonal y la retracción neuronal inducidos por MPP<sup>+</sup> y conduciendo, con ello, a una estabilización axonal en las células supervivientes (Kubo et al., 2007; Lehmann et al., 1999). Cabe destacar, no obstante, que este efecto se muestra insuficiente para alcanzar un incremento significativo en

la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas tratadas con MPP<sup>+</sup>. No se observó, sin embargo, aumento significativo en la longitud de las neuritas dopaminérgicas en cultivos tratados únicamente con Y-27632 lo que está en concordancia con estudios anteriores que demuestran que, en condiciones basales, el efecto de Y-27632 es mínimo o ausente, y que sólo se manifiesta para estimular el crecimiento o frenar la retracción en entornos inhibitorios más que para causar un efecto general en la extensión axonal independientemente del entorno (Borisoff et al., 2003; Kubo et al., 2007). Durante las dos últimas décadas, un gran número de estudios han investigado los procesos celulares en los que se haya implicada la vía ROCK (Amano et al., 2010; Amin et al., 2013; Schmandke et al., 2007). Así se sabe que, en las neuronas, la activación de ROCK está involucrada en el colapso y la retracción axonal a través de la modulación que ejerce sobre la cadena ligera de la miosina, la fosforilación de la quinasa LIM y otros mecanismos (Borisoff et al., 2003; Gallo, 2004; Lehmann et al., 1999). En astrocitos, ROCK se ha relacionado con el crecimiento de procesos de astrocitos y respuestas migratorias (Höltje et al., 2005; Lau et al., 2011), con la inhibición del crecimiento axonal (Chan et al., 2007) y con la producción de factores estimulantes de colonias de granulocitos (Ding et al., 2009). En los oligodendrocitos, ROCK está involucrada en el control de la polaridad y la migración axonal durante el desarrollo de la mielinización y en la migración a lugares lesionados en adultos (Binamé et al., 2013), así como en la regulación de los niveles de ROS (Paintlia et al., 2013).

A pesar de estar implicada en un gran número de procesos celulares que ocurren en distintos tipos de células hay que destacar que numerosos estudios demuestran que ROCK se expresa predominante en la microglía en comparación con neuronas y otras células gliales (Ding et al., 2010; Villar-Cheda et al., 2012a; Zhang et al., 2008). Los resultados presentados en este trabajo muestran claramente que la inhibición de la ROCK microglial es esencial para inducir una disminución significativa en la muerte de neuronas dopaminérgicas, lo cual es consistente con nuestros datos anteriores que muestran que la inhibición ROCK bloquea la respuesta inflamatoria microglial inducida por MPTP tanto *in vitro* como *in vivo* (Villar-Cheda et al., 2012a).

El análisis post-mortem de muestras de estriado y SN en pacientes con EP así como modelos animales de la enfermedad, ha desvelado activación microglial y un incremento en los niveles de mediadores proinflamatorios y ROS (Collins et al., 2012; Lull and Block, 2010). En consonancia con esto, también se ha observado un aumento de la actividad ROCK

bajo condiciones que implican una mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas: edad avanzada (Komagome et al., 2000), depleción estrogénica (Rodríguez-Pérez et al., 2013b) e hiperactivación del SRA cerebral (Villar-Cheda et al., 2012b).

Los resultados sugieren que los inhibidores de ROCK descenden la muerte dopaminérgica en modelos experimentales de la EP y posiblemente en la EP inhibiendo la respuesta inflamatoria microglial y que los efectos observados sobre la estabilización axonal y sobre otras células gliales pueden resultar beneficiosos.

Fasudil e Y-27632 son dos inhibidores de ROCK, ampliamente utilizados en los modelos experimentales de enfermedades, y han demostrado ser neuroprotectores eficaces contra neurotoxinas dopaminérgicas (Tönges et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012a). En el caso concreto del fasudil, su seguridad ya ha sido testada ya que lleva administrándose desde 1995 en el tratamiento de la hemorragia subaracnoidea y el vasoespasmo cerebral en Japón.

No obstante, no cabe duda de que son necesarios más esfuerzos encaminados al desarrollo de nuevos inhibidores de ROCK y/o estrategias de combinación con otros fármacos que pudiesen actuar sinérgicamente para frenar la degeneración dopaminérgica y otros trastornos del sistema nervioso central (Chen et al., 2013; Pan et al., 2013).

En conclusión, los inhibidores de ROCK pueden proporcionar una nueva estrategia neuroprotectora contra la EP y otros procesos cerebrales en los que la neuroinflamación sea un componente relevante.

### **5.3 INTERACCIÓN ENTRE EL COMPLEJO NADPH-OXIDASA Y ROCK-QUINASA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL INDUCIDA POR ANGIOTENSINA**

El tratamiento con inhibidores de NADPH-oxidasa o ROCK ha demostrado efectos neuroprotectores en modelos experimentales de la EP (Ghosh et al., 2012; Tönges et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012a; Villar-Cheda et al., 2012b) y un marcado descenso en la degeneración dopaminérgica inducida por AII (Rey et al., 2007; Villar-Cheda et al., 2012a).

Como ya se mencionó, el complejo NADPH-oxidasa ha sido identificado en neuronas dopaminérgicas y células gliales. Su activación a nivel neuronal puede contribuir a la progresión de la muerte de dichas células (Choi et al., 2012b; Rodríguez-Pallares et al., 2012a; Zawada et al., 2011). Sin embargo, la activación microglial del complejo NADPH-oxidasa juega un papel más relevante en la progresión de la degeneración dopaminérgica



inducida por AII (Joglar et al., 2009; Rodriguez-Pallares et al., 2008) y otros factores (Choi et al., 2012a; Qin et al., 2013; Qin et al., 2007).

Es bien sabido que en las células no fagocíticas, tales como neuronas, el complejo NADPH-oxidasas produce bajos niveles de ROS intracelular que actúan como segundos mensajeros en varias rutas de señalización celular (Choi et al., 2012a; Qin et al., 2004; Touyz et al., 2002).

En microglía y otras células inflamatorias, las ROS derivadas de la activación del complejo NADPH-oxidasas median vías implicadas en la respuesta inflamatoria, y el complejo NADPH-oxidasas produce, además, altas concentraciones de ROS que se liberan extracelularmente para, con ello, eliminar microorganismos invasores o residuos celulares (Babior, 2004; Ray and Shah, 2005; Rojo et al., 2014).

Como ya se mencionó previamente, tras la fagocitosis, en los macrófagos se produce un aumento brusco en la formación de superóxidos, conocido como “oxidative burst” catalizado por complejo NADPH-oxidasas de la membrana (Babior, 1999). Consistente con esto, se ha demostrado que el complejo NADPH-oxidasas juega un papel crítico en la modulación del fenotipo microglial hacia el estado proinflamatorio activado M1 (Choi et al., 2012a).

En el presente trabajo, mediante estudios *in vivo* e *in vitro* se demuestra que la AII produce un aumento en los niveles de los marcadores de fenotipo M1 y una disminución en los marcadores de fenotipo M2. Estos cambios son bloqueados tras la inhibición de la activación del complejo NADPH-oxidasas o de la vía RhoA/ROCK.

En el primer trabajo que integra esta tesis se probó que la AII inducía un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  microglial, un marcador bien conocido del fenotipo microglial M1 (Chhor et al., 2013). Este incremento fue bloqueado por la inhibición del complejo NADPH-oxidasas o de la vía RhoA/ROCK (Borrajó et al., 2014a).

Estudios anteriores han observado que los inhibidores de ROCK regulan la polarización microglial (Barcia et al., 2012; Zhang et al., 2013) y en el presente estudio se demuestra como la inhibición de ROCK disminuye los niveles de marcadores de fenotipo M1 inducidos por AII y aumenta la expresión de los marcadores del fenotipo M2.

La activación anormal de la ruta de RhoA/ROCK se ha observado en diversos trastornos de tejidos periféricos (Mueller et al., 2005; Olson, 2008; Pan et al., 2009), y del SNC en los que la neuroinflamación tiene un papel determinante, incluyendo modelos de lesión de la médula espinal, enfermedades desmielinizantes inflamatorias, accidente cerebrovascular y

excitotoxicidad (Chen et al., 2013; Mueller et al., 2005; Sheikh et al., 2009; Tönges et al., 2014). En concordancia con lo expuesto, varios estudios recientes han demostrado que la activación de la vía RhoA/ROCK está implicada en la degeneración de células dopaminérgicas inducida por MPTP y, posiblemente, en la EP, y que los inhibidores de ROCK disminuyen la muerte celular dopaminérgica inducida por MPTP (Tönges et al., 2012; Villar-Cheda et al., 2012a). Se ha demostrado que el mecanismo neuroprotector está relacionado con la inhibición de la respuesta microglial inducida por MPTP (Villar-Cheda et al., 2012a).

Como demostramos en la presente tesis doctoral, los inhibidores de ROCK bloquean la liberación microglial de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  (Borrajó et al., 2014b). Sin embargo, se desconoce la existencia de una interrelación entre la vía RhoA y la activación del complejo NADPH-oxidasa durante el proceso de activación microglial, y en particular en la activación microglial inducida por AII.

Varios estudios anteriores han demostrado que la activación de la NADPH oxidasa y la activación ROCK son responsables de los principales componentes de la respuesta microglial, como los cambios que implican la motilidad microglial y la fagocitosis, la generación de superóxido y la liberación de citoquinas inflamatorias. El presente estudio muestra que ambas vías están vinculadas por un mecanismo común que podría constituir un medio básico de coordinación de la respuesta microglial.

Los resultados del presente estudio muestran que en el mesencéfalo ventral de rata la activación del complejo NADPH-oxidasa está implicado en la activación de la vía RhoA/ROCK inducida por AII y que la activación de la vía RhoA/ROCK está implicada en la activación del complejo NADPH-oxidasa inducida por AII. También se observó que la AII, en la región de la SN, induce la expresión de marcadores del fenotipo M1 microglial, expresión que se ve bloqueada tras la inhibición del complejo NADPH-oxidasa y de la vía RhoA/ROCK, confirmando así, la participación de la respuesta microglial en los efectos observados en el SN de rata. En el presente estudio, se ha investigado la interacción NADPH-oxidasa/ROCK en la zona del mesencéfalo ventral por dos razones: a) Es un zona particularmente interesante para alcanzar un mejor conocimiento de la EP; b) Nuestro grupo ha empleado el mismo modelo *in vivo* en varios estudios anteriores (Garrido-Gil et al., 2013; Rey et al., 2007), que revelaron una respuesta microglial en la SN después de la inyección intraventricular de AII. En cultivos de la línea microglial N9 y en cultivos enriquecidos en

microglía primaria, se observó que durante la activación microglial inducida por AII hay una interregulación entre NADPH-oxidasas y ROCK en forma de retroalimentación positiva. La estimulación por AII, a través de los receptores AT1, induce la activación del complejo NADPH-oxidasas y la generación de superóxido (Joglar et al., 2009; Rodríguez-Pallares et al., 2008). Nuestros resultados muestran que la activación del complejo NADPH-oxidasas inducida por AII y la generación de superóxidos provocan la translocación de NF- $\kappa$ B y la activación de la vía RhoA/ROCK. También se observó que la activación de la vía RhoA/ROCK participa en la regulación de la activación de la vía NADPH-oxidasas vía p38 MAPK (del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases). Además, encontramos que la activación ROCK regula al alza la expresión de receptores AT1 en las células microgliales.

Varios estudios en células no inflamatorias periféricas, tales como células vasculares, han sugerido que AII puede activar la vía RhoA/ROCK independientemente de la activación del complejo NADPH-oxidasas (Hiroki et al., 2004; Mattson and Maudsley, 2009; Ohtsu et al., 2006). Sin embargo, también existen datos a favor de que los inhibidores de ROCK suprimen la activación de NADPH-oxidasas (Budzyn et al., 2006; Higashi et al., 2003) y datos que sugieren que los inhibidores de la NADPH-oxidasas suprimen la actividad ROCK (Li and Shah, 2003) aunque los mecanismos definitivos implicados en esta potencial interacción no han sido aclarados hasta el momento. En el presente estudio aclaramos la controversia ya que demostramos que la activación de la vía RhoA/ROCK mediada por AII está regulada por el aumento de ROS NADPH-dependientes, ya que la inhibición de la activación del complejo NADPH-oxidasas con apocinina o inhibición de ROS con N-acetilcisteína evita la activación de la vía RhoA/ROCK. También queda demostrado que se requiere de la activación NF- $\kappa$ B para la activación de la vía RhoA/ROCK inducida por AII, puesto que dicha activación es abolida tras la administración del inhibidor del NF- $\kappa$ B, PDTC. Se sabe que ROS, en calidad de segundos mensajeros, pueden modular vías de señalización redox-sensibles tales como las reguladas por NF- $\kappa$ B que están involucrados en la respuesta inflamatoria (Gilmore, 2006; Sheikh et al., 2009), incluyendo la liberación de citoquinas tales como TNF- $\alpha$  (Borrajó et al., 2014b).

Los presentes resultados también muestran que la vía RhoA/ROCK está involucrada en regulación de la producción de ROS por el complejo NADPH-oxidasas de las células

microgliales, debido a que el aumento en la activación del complejo NADPH-oxidasa inducido por AII es bloqueado por el tratamiento con el inhibidor de ROCK, Y-27632.

También se investigó la posibilidad de que p38 MAPK medie la activación del complejo NADPH-oxidasa inducida por ROCK en las células microgliales. Estudios previos en neutrófilos sugieren que p38 MAPK puede estar implicada en la activación del complejo NADPH-oxidasa y en la translocación de los componentes citosólicos a la membrana plasmática durante la fagocitosis (Detmers et al., 1998; Yamamori et al., 2002), aunque algunos resultados han sido objeto de controversia (Tsai et al., 2013). Además, se observó la activación de RhoA/ROCK dependiente de p38 MAPK en diferentes tipos de células (Calleros et al., 2006; Senokuchi et al., 2005). En las células microgliales, se observó que la AII indujo un aumento significativo en la fosforilación de la proteína p38 MAPK, y que dicho incremento está mediado por ROCK, ya que es inhibido por Y-27632. A su vez, la proteína p38 MAPK media la activación del complejo NADPH-oxidasa inducida por AII ya que dicha activación es inhibida por SB-203580, inhibidor de p38 MAPK. Estos resultados son consistentes con estudios recientes en los que se describe que la inhibición de p38 MAPK reduce la generación de superóxido y la degeneración dopaminérgica en cultivos de neuronas/glia (Wang et al., 2011), y sugieren también que desempeña un papel determinante en la activación del complejo NADPH- oxidasa microglial.

Por último, los presentes resultados también sugieren que la vía RhoA/ROCK regula la producción de ROS por el complejo NADPH-oxidasa y la respuesta inflamatoria en las células microgliales por un segundo mecanismo de retroalimentación positiva que conduce a una regulación al alza de los receptores AT1. El tratamiento de las células microgliales con AII induce una regulación al alza de los receptores AT1 que se bloquea tras la inhibición de la vía ROCK. Este efecto está mediado por la regulación al alza del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (figura 9).

Los presentes resultados revelan que AII activa tanto el complejo NADPH-oxidasa como la vía RhoA/ROCK y que ambas están unidas por un mecanismo común. Varios estudios anteriores han demostrado que el complejo NADPH-oxidasa y ROCK son responsables de los principales componentes de la respuesta microglial, como los cambios que implican la motilidad microglial y la fagocitosis, la generación de superóxido y la liberación de citoquinas inflamatorias. En conjunto, sugiere que el mecanismo observado en el presente estudio puede constituir un medio básico de coordinación de la respuesta microglial.





## **CONCLUSIONES**



De los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Existe una interacción importante entre el SRA y la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$ . Ésta media el incremento de muerte dopaminérgica inducida por AII.
2. AII incrementa los niveles de TNF- $\alpha$  vía AT1, activa el complejo NADPH-oxidasa y promueve la translocación de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, AII no incrementa los niveles de TNF- $\alpha$  en ausencia de microglía lo que demuestra que el TNF- $\alpha$  microglial es un factor determinante en la degeneración dopaminérgica inducida por AII.
3. El mecanismo neuroprotector de la inhibición de la vía RhoA/ROCK en la degeneración dopaminérgica se debe a la inhibición de la respuesta microglial. Los inhibidores de ROCK inducen, además, un efecto directo contra la retracción axonal en las neuronas supervivientes, sin embargo, este último efecto no se muestra suficiente para lograr un incremento significativo en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas tras el tratamiento con MPP<sup>+</sup>.
4. La activación del complejo NADPH-oxidasa está implicada en la activación de la vía RhoA/ROCK inducida por AII, y la activación de la vía RhoA/ROCK, a su vez, está implicada en la activación del complejo NADPH-oxidasa mediada por AII.
5. AII, a través de su unión a los receptores AT1, induce la activación del complejo NADPH-oxidasa, y por tanto, la generación de superóxido, lo cual provoca la translocación de NF- $\kappa$ B y la activación de la vía RhoA/ROCK. Esta activación de ROCK, a su vez, induce la activación del complejo NADPH-oxidasa vía p38 MAPK. Además, la activación de ROCK, vía NF- $\kappa$ B, regula al alza la expresión de los receptores AT1 en las células microgliales. Esta importante interacción entre la vía RhoA/ROCK y la activación del complejo NADPH-oxidasa indica la existencia de un mecanismo común entre los principales componentes implicados en la respuesta microglial, incluidos los cambios en la motilidad y la fagocitosis microglial, la generación de superóxido y la liberación de citoquinas inflamatorias.







## **BIBLIOGRAFÍA**



- Aisen, P. S. (2002). The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* **1**, 279-284.
- Allain, H., Bentué-Ferrer, D., and Akwa, Y. (2008). Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* **84**, 25-39.
- Allen, A. M., MacGregor, D. P., Chai, S. Y., Donnan, G. A., Kaczmarczyk, S., Richardson, K., Kalnins, R., Ireton, J., and Mendelsohn, F. A. (1992). Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Annals of neurology* **32**, 339-344.
- Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Experimental cell research* **261**, 44-51.
- Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* **67**, 545-554.
- Amar, S., Van Dyke, T., Eugster, H.-P., Schultze, N., Koebel, P., and Bluethmann, H. (1994). Tumor necrosis factor (TNF)-induced cutaneous necrosis is mediated by TNF receptor 1. *Journal of inflammation* **47**, 180-189.
- Amin, E., Dubey, B. N., Zhang, S.-C., Gremer, L., Dvorsky, R., Moll, J. M., Taha, M. S., Nagel-Steger, L., Piekorz, R. P., and Somlyo, A. V. (2013). Rho-kinase: regulation, (dys) function, and inhibition. *Biological chemistry* **394**, 1399-1410.
- Ansari, K., Yu, P., Kruck, T., and Tatton, W. (1993). Rescue of axotomized immature rat facial motoneurons by R (-)-deprenyl: stereospecificity and independence from monoamine oxidase inhibition. *The Journal of neuroscience* **13**, 4042-4053.
- Ashwell, K. (1990). Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Developmental Brain Research* **55**, 219-230.
- Aspenström, P. (1999). The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Experimental cell research* **246**, 20-25.
- Averill, D. B., and Diz, D. I. (2000). Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain research bulletin* **51**, 119-128.
- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1476.
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine* **109**, 33-44.
- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current opinion in immunology* **16**, 42-47.
- Baker, K. M., Chernin, M. I., Schreiber, T., Sanghi, S., Haiderzaidi, S., Booz, G. W., Dostal, D. E., and Kumar, R. (2004). Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regulatory peptides* **120**, 5-13.
- Banks, R., Mozley, L., and Dourish, C. (1994). The angiotensin converting enzyme inhibitors captopril and enalapril inhibit apomorphine-induced oral stereotypy in the rat. *Neuroscience* **58**, 799-805.
- Barcia, C., Ros, C. M., Annese, V., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ros-Bernal, F., Gómez, A., Yuste, J. E., Campuzano, C. M., De Pablos, V., and Fernandez-Villalba, E. (2012). ROCK/Cdc42-mediated microglial motility and gliapse formation lead to phagocytosis of degenerating dopaminergic neurons in vivo. *Scientific reports* **2**, 809.
- Barcia, C., Curtin, J., Zirger, J., and Larocque, D. (2013). Immunology and the Central Nervous System. *Clinical and Developmental Immunology* **2013**.
- Batchelor, P. E., Liberatore, G. T., Wong, J. Y., Porritt, M. J., Frerichs, F., Donnan, G. A., and Howells, D. W. (1999). Activated macrophages and microglia induce dopaminergic

- sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience* **19**, 1708-1716.
- Bauer, P. O., Wong, H. K., Oyama, F., Goswami, A., Okuno, M., Kino, Y., Miyazaki, H., and Nukina, N. (2009). Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 13153-13164.
- Becker, C., Jick, S. S., and Meier, C. R. (2008). Use of antihypertensives and the risk of Parkinson disease. *Neurology* **70**, 1438-1444.
- Benabid, A. L. (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current opinion in neurobiology* **13**, 696-706.
- Benigni, A., Cassis, P., and Remuzzi, G. (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO molecular medicine* **2**, 247-257.
- Benner, E. J., Mosley, R. L., Destache, C. J., Lewis, T. B., Jackson-Lewis, V., Gorantla, S., Nemachek, C., Green, S. R., Przedborski, S., and Gendelman, H. E. (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9435-9440.
- Bermel, C., Tönges, L., Planchamp, V., Gillardon, F., Weishaupt, J. H., Dietz, G. P., Bähr, M., and Lingor, P. (2009). Combined inhibition of Cdk5 and ROCK additively increase cell survival, but not the regenerative response in regenerating retinal ganglion cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* **42**, 427-437.
- Bernhart, E., Kollroser, M., Rechberger, G., Reicher, H., Heinemann, A., Schratl, P., Hallström, S., Wintersperger, A., Nussold, C., and DeVaney, T. (2010). Lysophosphatidic acid receptor activation affects the C13NJ microglia cell line proteome leading to alterations in glycolysis, motility, and cytoskeletal architecture. *Proteomics* **10**, 141-158.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., and Greenamyre, J. T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* **24**, 308-318.
- Bialecka, M., Klodowska-Duda, G., Kurzawski, M., Slawek, J., Gorzkowska, A., Opala, G., Bialecki, P., Sagan, L., and Drożdżik, M. (2008). Interleukin-10 (IL10) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF) gene polymorphisms in Parkinson's disease patients. *Parkinsonism & related disorders* **14**, 636-640.
- Binamé, F., Sakry, D., Dimou, L., Jolivel, V., and Trotter, J. (2013). NG2 regulates directional migration of oligodendrocyte precursor cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. *The Journal of Neuroscience* **33**, 10858-10874.
- Bishop, A., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. j* **348**, 241-255.
- Blandini, F., Armentero, M.-T., and Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism & related disorders* **14**, S124-S129.
- Block, M. L., and Hong, J.-S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* **76**, 77-98.
- Block, M. L., Zecca, L., and Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 57-69.
- Block, M. L. (2008). NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC neuroscience* **9**, S8.
- Blum, D., Torch, S., Nissou, M.-F., Benabid, A.-L., and Verna, J.-M. (2000). Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neuroscience letters* **283**, 193-196.
- Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., and Hirsch, E. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's

- disease. *Neuroscience letters* **172**, 151-154.
- Bonuccelli, U., and Del Dotto, P. (2006). New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease. *Neurology* **67**, S30-S38.
- Borisoff, J. F., Chan, C. C., Hiebert, G. W., Oschipok, L., Robertson, G. S., Zamboni, R., Steeves, J. D., and Tetzlaff, W. (2003). Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates. *Molecular and Cellular Neuroscience* **22**, 405-416.
- Borrajó, A., Rodríguez-Pérez, A. I., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., and Labandeira-García, J. L. (2014a). Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death. *Neuropharmacology* **85**, 1-8.
- Borrajó, A., Rodríguez-Pérez, A. I., Díaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., and Labandeira-García, J. L. (2014b). Microglial TNF- $\alpha$  mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia* **62**, 145-157.
- Bové, J., Prou, D., Perier, C., and Przedborski, S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* **2**, 484-494.
- Bowerman, M., Murray, L. M., Boyer, J. G., Anderson, C. L., and Kothary, R. (2012). Fasudil improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy. *BMC medicine* **10**, 24.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., and Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and tissue research* **318**, 121-134.
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.-H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J., and Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor  $\kappa$ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of experimental medicine* **202**, 145-156.
- Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V. I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S. R., and Bethea, J. R. (2009). Transgenic inhibition of astroglial NF- $\kappa$ B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *The Journal of Immunology* **182**, 2628-2640.
- Brambilla, R., Dvorianchikova, G., Barakat, D., Ivanov, D., Bethea, J. R., and Shestopalov, V. I. (2012). Transgenic inhibition of astroglial NF- $\kappa$ B protects from optic nerve damage and retinal ganglion cell loss in experimental optic neuritis. *J. Neuroinflammation* **9**, 213.
- Brownfield, M., Reid, I., Ganten, D., and Ganong, W. (1982). Differential distribution of immunoreactive angiotensin and angiotensin-converting enzyme in rat brain. *Neuroscience* **7**, 1759-1769.
- Budzyn, K., Marley, P. D., and Sobey, C. G. (2006). Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends in pharmacological sciences* **27**, 97-104.
- Burke, R. E., and O'Malley, K. (2013). Axon degeneration in Parkinson's disease. *Experimental neurology* **246**, 72-83.
- Calleros, L., Lasa, M., Rodríguez-Álvarez, F. J., Toro, M. J., and Chiloeches, A. (2006). RhoA and p38 MAPK mediate apoptosis induced by cellular cholesterol depletion. *Apoptosis* **11**, 1161-1173.
- Carey, R. M. (2005). Update on the role of the AT2 receptor. *Current opinion in nephrology and hypertension* **14**, 67-71.

## Bibliografía

- Carvey, P., Chen, E.-Y., Lipton, J., Tong, C., Chang, Q., and Ling, Z. (2005). Intra-parenchymal injection of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1- $\beta$  produces dopamine neuron loss in the rat. *Journal of neural transmission* **112**, 601-612.
- Cassis, P., Conti, S., Remuzzi, G., and Benigni, A. (2010). Angiotensin receptors as determinants of life span. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **459**, 325-332.
- Cleeter, M., Cooper, J., and Schapira, A. (1992). Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *Journal of neurochemistry* **58**, 786-789.
- Clerk, A., and Sugden, P. H. (2000). Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circulation Research* **86**, 1019-1023.
- Cohen, G., Pasik, P., Cohen, B., Leist, A., Mytilineou, C., and Yahr, M. D. (1984). Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *European journal of pharmacology* **106**, 209-210.
- Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology* **4**, 399-418.
- Collins, L. M., Toulouse, A., Connor, T. J., and Nolan, Y. M. (2012). Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* **62**, 2154-2168.
- Cordero, M. D., de Miguel, M., and Moreno-Fernández, A. M. (2011). La disfunción mitocondrial en la fibromialgia y su implicación en la patogénesis de la enfermedad. *Medicina clínica* **136**, 252-256.
- Crain, J. M., Nikodemova, M., and Watters, J. J. (2013). Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *Journal of neuroscience research* **91**, 1143-1151.
- Crawford, G., Le, W., Smith, R., Xie, W., Stefani, E., and Appel, S. (1992). A novel N18TG2 x mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *The Journal of neuroscience* **12**, 3392-3398.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N., and Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC-1 $\alpha$  by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* **127**, 59-69.
- Culman, J., Blume, A., Gohlke, P., and Unger, T. (2002). The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT (1)-receptor blockers. *Journal of human hypertension* **16**, S64-70.
- Chai, S. Y., Mendelsohn, F., and Paxinos, G. (1987). Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography. *Neuroscience* **20**, 615-627.
- Chai, S. Y., McKenzie, J. S., McKinley, M. J., and Mendelsohn, F. A. (1990). Angiotensin converting enzyme in the human basal forebrain and midbrain visualized by in vitro autoradiography. *Journal of Comparative Neurology* **291**, 179-194.
- Chan, C., Wong, A. K., Liu, J., Steeves, J. D., and Tetzlaff, W. (2007). ROCK inhibition with Y27632 activates astrocytes and increases their expression of neurite growth-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia* **55**, 369-384.
- Chaná, P. (2009). Avances en tratamiento medico de la enfermedad de Parkinson [Advances in the medical treatment of Parkinson's disease]. *Parkinsonism & related disorders* **15**, S22-S25.
- Chang, R. C., Hudson, P., Wilson, B., Haddon, L., and Hong, J.-S. (2000). Influence of neurons on lipopolysaccharide-stimulated production of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  by cultured glia. *Brain research* **853**, 236-244.

- Chang, Y. P., and Shih, P. Y. (2009). A case of Parkinson's disease worsened by captopril: An unexpected adverse effect. *Movement Disorders* **24**, 790-790.
- Chao, C., Hu, S., Molitor, T., Shaskan, E., and Peterson, P. (1992). Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *The Journal of Immunology* **149**, 2736-2741.
- Chen, M., Liu, A., Ouyang, Y., Huang, Y., Chao, X., and Pi, R. (2013). Fasudil and its analogs: a new powerful weapon in the long war against central nervous system disorders? *Expert opinion on investigational drugs* **22**, 537-550.
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., and O'Banion, M. K. (2014a). Are "resting" microglia more "M2"? *Frontiers in immunology* **5**, 594.
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., and O'Banion, M. K. (2014b). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* **11**, 98.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.-V., Celador, I. L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., and Sävman, K. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity* **32**, 70-85.
- Choi, D.-H., Cristóvão, A. C., Guhathakurta, S., Lee, J., Joh, T. H., Beal, M. F., and Kim, Y.-S. (2012a). NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling* **16**, 1033-1045.
- Choi, S. H., Aid, S., Kim, H. W., Jackson, S. H., and Bosetti, F. (2012b). Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *Journal of neurochemistry* **120**, 292-301.
- Chu, Y., Morfini, G. A., Langhamer, L. B., He, Y., Brady, S. T., and Kordower, J. H. (2012). Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain* **135(Pt 7)**, 2058-2073.
- Chung, J. Y., Lee, J. W., Ryu, C. H., Min, H. K., Yoon, Y. J., Lim, M. J., and Park, C. H. (2015). 1-[2-(4-Benzyloxyphenoxy) Ethyl] Imidazole inhibits monoamine oxidase B and protects against neuronal loss and behavioral impairment in rodent models of Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research* **93**, 1267-1278.
- Chung, O., Csikos, T., and Unger, T. (1999). Angiotensin II receptor pharmacology and AT1-receptor blockers. *Journal of human hypertension* **13**, S11-20; discussion S33-4.
- D'Amato, R. J., Alexander, G. M., Schwartzman, R. J., Kitt, C. A., Price, D. L., and Snyder, S. H. (1987). Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. *Nature*. **327**, 324-326.
- D\_anglemont\_de\_tassigny, X., Pascual, A., and Lopez-barneo, J. (2015). GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease. *Name: Frontiers in Neuroanatomy* **9**, 10.
- Da Costa, C. A., and Checler, F. (2011). Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cellular signalling* **23**, 963-968.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* **8**, 752-758.
- Davissón, R. L. (2003). Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **285**, R498-R511.
- de Farmacéuticos, C. O. (2006). Base de datos del Medicamento (BOT). *Explotación de bases del BOT*.



- de Gasparo, M., Catt, K., Inagami, T., Wright, J., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* **52**, 415-472.
- Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., and Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience* **30**, 12535-12544.
- DeLong, M. R., and Wichmann, T. (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of neurology* **64**, 20-24.
- Detmers, P. A., Zhou, D., Polizzi, E., Thieringer, R., Hanlon, W. A., Vaidya, S., and Bansal, V. (1998). Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in  $\beta$ 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *The Journal of Immunology* **161**, 1921-1929.
- Deumens, R., Blokland, A., and Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental neurology* **175**, 303-317.
- Dexter, D., Carter, C., Wells, F., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C. D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* **52**, 381-389.
- Dick, F. D. (2006). Parkinson's disease and pesticide exposures. *British medical bulletin* **79**, 219-231.
- Ding, F., Yin, Z., and Wang, H.-R. (2011). Ubiquitination in Rho signaling. *Current topics in medicinal chemistry* **11**, 2879-2887.
- Ding, J., Yu, J.-Z., Li, Q.-Y., Wang, X., Lu, C.-Z., and Xiao, B.-G. (2009). Rho kinase inhibitor Fasudil induces neuroprotection and neurogenesis partially through astrocyte-derived G-CSF. *Brain, behavior, and immunity* **23**, 1083-1088.
- Ding, J., Li, Q. Y., Wang, X., Sun, C. H., Lu, C. Z., and Xiao, B. G. (2010). Fasudil protects hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury by suppressing microglial inflammatory responses in mice. *Journal of neurochemistry* **114**, 1619-1629.
- Dunnett, S. B., Björklund, A., and Lindvall, O. (2001). Cell therapy in Parkinson's disease—stop or go? *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 365-369.
- Duty, S., and Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology* **164**, 1357-1391.
- Ehlers, S. (2003). Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Annals of the rheumatic diseases* **62**, ii37-ii42.
- Epstein, F. H., Choy, E. H., and Panayi, G. S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* **344**, 907-916.
- Evans, J. R., and Barker, R. A. (2008). Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 437-447.
- Fahn, S. (1992). A pilot trial of high-dose alpha-tocopherol and ascorbate in early Parkinson's disease. *Annals of neurology* **32**, S128-S132.
- Fargel, M., Grobe, B., Oesterle, E., Hastedt, C., and Rupp, M. (2007). Treatment of Parkinson's Disease. *Clinical drug investigation* **27**, 207-218.
- Feany, M. B., and Bender, W. W. (2000). A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* **404**, 394-398.
- Fenn, A. M., Henry, C. J., Huang, Y., Dugan, A., and Godbout, J. P. (2012). Lipopolysaccharide-

- induced interleukin (IL)-4 receptor- $\alpha$  expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain, behavior, and immunity* **26**, 766-777.
- Ferger, B., Leng, A., Mura, A., Hengerer, B., and Feldon, J. (2004). Genetic ablation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *Journal of neurochemistry* **89**, 822-833.
- Fillit, H., Ding, W., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., and Wolf-Klein, G. (1991). Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* **129**, 318-320.
- Fink, J. S., Schumacher, J. M., Ellias, S. L., Palmer, E., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., and Kott, H. S. (1999). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell transplantation* **9**, 273-278.
- Flier, J. S., Underhill, L. H., Bazzoni, F., and Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New England Journal of Medicine* **334**, 1717-1725.
- Frucht, S., and Greene, P. E. (2002). An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): Treatment guidelines. *Neurology* **58**, 156-157.
- Gallo, G. (2004). Myosin II activity is required for severing-induced axon retraction in vitro. *Experimental neurology* **189**, 112-121.
- Ganong, W. F. (1994). Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Experimental Biology and Medicine* **205**, 213-219.
- Ganten, D., Marquez-Julio, A., Granger, P., Hayduk, K., Karsunky, K. P., Boucher, R., and Genest, J. (1971). Renin in dog brain. *Am J Physiol* **221**, 1733-1737.
- Gao, H.-M., Liu, B., and Hong, J.-S. (2003). Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience* **23**, 6181-6187.
- Gao, H.-M., and Hong, J.-S. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in immunology* **29**, 357-365.
- Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M. A., and Ascherio, A. (2011). Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology* **76**, 863-869.
- Garrido-Gil, P., Joglar, B., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Involvement of PPAR- $\alpha$  in the neuroprotective and anti-inflammatory effects of angiotensin type 1 receptor inhibition: effects of the receptor antagonist telmisartan and receptor deletion in a mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of neuroinflammation* **9**, 38.
- Garrido-Gil, P., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Lanciego, J. L., and Labandeira-Garcia, J. L. (2013). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Structure and Function* **218**, 373-388.
- Ge, J., and Barnes, N. M. (1996). Alterations in angiotensin AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology* **297**, 299-306.
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B., and Brooks, D. J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* **21**, 404-412.

## Bibliografía

- Ghosh, A., Kanthasamy, A., Joseph, J., Anantharam, V., Srivastava, P., Dranka, B. P., Kalyanaraman, B., and Kanthasamy, A. G. (2012). Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **9**, 241.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-6684.
- Girard, S., Brough, D., Lopez-Castejon, G., Giles, J., Rothwell, N. J., and Allan, S. M. (2013). Microglia and macrophages differentially modulate cell death after brain injury caused by oxygen-glucose deprivation in organotypic brain slices. *Glia* **61**, 813-824.
- Glover, V., Sandler, M., Owen, F., and Riley, G. (1977). Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature* **265**, 80-81.
- Gómez-Palacio Schjetnan, A., and Escobar-Rodríguez, M. (2007). Codificación y retención de la memoria: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la plasticidad sináptica. *Revista de neurología* **45**, 409-417.
- Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Ahmadi, F. A., Hoover, B. R., Snell, L. D., Skoch, J., Jhaveri, V. V., Poczubutt, A. M., Weyhenmeyer, J. A., and Zawada, W. M. (2007). Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener* **2**, 1.
- Greenwood, J., Walters, C. E., Pryce, G., Kanuga, N., Beraud, E., Baker, D., and Adamson, P. (2003). Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The FASEB journal* **17**, 905-907.
- Griendling K.K., Sorescu D., and Ushio-Fukai M. (2000). NADPH oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Res* **86**, 494-501.
- Gu, Z., Feng, X., Dong, X., and Chan, P. (2010a). Smoking, genes encoding dopamine pathway and risk for Parkinson's disease. *Neuroscience letters* **482**, 31-34.
- Gu, Z., Nakamura, T., and Lipton, S. A. (2010b). Redox reactions induced by nitrosative stress mediate protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology* **41**, 55-72.
- Gupta, A., and Dawson, T. M. (2007). The role of stem cells in Parkinson's disease. *Neurosurgery Clinics of North America* **18**, 129-142.
- Haas, R. H., Parikh, S., Falk, M. J., Saneto, R. P., Wolf, N. I., Darin, N., Wong, L.-J., Cohen, B. H., and Naviaux, R. K. (2008). The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Molecular genetics and metabolism* **94**, 16-37.
- Haglid, K., Wang, S., Qiner, Y., and Hamberger, A. (1994). Excitotoxicity. *Molecular neurobiology* **9**, 259-263.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* **59**, 1609-1623.
- Han, Y., Runge, M. S., and Brasier, A. R. (1999). Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- $\kappa$ B transcription factors. *Circulation Research* **84**, 695-703.
- Hanisch, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140-155.
- Harms, A. S., Barnum, C. J., Ruhn, K. A., Varghese, S., Treviño, I., Blesch, A., and Tansey, M. G. (2011). Delayed dominant-negative TNF gene therapy halts progressive loss of nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Molecular Therapy* **19**, 46-52.
- Harms A.S., Lee J.K., Nguyen T.A., Chang J., Ruhn K.M., Treviño I., and Tansey M.G. (2012).

- Regulation of microglia effector functions by tumor necrosis factor signaling. *Glia* **60**, 189–202.
- Hedlund, E., and Perlmann, T. (2009). Neuronal cell replacement in Parkinson's disease. *Journal of internal medicine* **266**, 358-371.
- Henze, C., Hartmann, A., Lescot, T., Hirsch, E. C., and Michel, P. P. (2005). Proliferation of microglial cells induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in mesencephalic cultures results from an astrocyte-dependent mechanism: role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Journal of neurochemistry* **95**, 1069-1077.
- Hermann, K., McDonald, W., Unger, T., Lang, R., and Ganten, D. (1983). Angiotensin biosynthesis and concentrations in brain of normotensive and hypertensive rats. *Journal de physiologie* **79**, 471-480.
- Herrera, A., Castano, A., Venero, J., Cano, J., and Machado, A. (2000). The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiology of disease* **7**, 429-447.
- Herskowitz, J. H., Feng, Y., Mattheyses, A. L., Hales, C. M., Higginbotham, L. A., Duong, D. M., Montine, T. J., Troncoso, J. C., Thambisetty, M., and Seyfried, N. T. (2013). Pharmacologic Inhibition of ROCK2 Suppresses Amyloid- $\beta$  Production in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *The Journal of Neuroscience* **33**, 19086-19098.
- Higashi, M., Shimokawa, H., Hattori, T., Hiroki, J., Mukai, Y., Morikawa, K., Ichiki, T., Takahashi, S., and Takeshita, A. (2003). Long-Term Inhibition of Rho-Kinase Suppresses Angiotensin II–Induced Cardiovascular Hypertrophy in Rats In Vivo Effect on Endothelial NAD (P) H Oxidase System. *Circulation research* **93**, 767-775.
- Hiroki, J., Shimokawa, H., Higashi, M., Morikawa, K., Kandabashi, T., Kawamura, N., Kubota, T., Ichiki, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2004). Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* **37**, 537-546.
- Hirsch, E. C., and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet Neurology* **8**, 382-397.
- Hirsch, E. C., Vyas, S., and Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* **18**, S210-S212.
- Hirsch, E. C., Jenner, P., and Przedborski, S. (2013). Pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders* **28**, 24-30.
- Hodaie, M., Neimat, J. S., and Lozano, A. M. (2007). The Dopaminergic Nigrostriatal System and Parkinson's Disease: Molecular Events in Development, Disease, and Cell Death, and New Therapeutic Strategies. *Neurosurgery* **60**, 17-30.
- Hofman, F., Hinton, D., Johnson, K., and Merrill, J. (1989). Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *The Journal of experimental medicine* **170**, 607-612.
- Höltje, M., Hoffmann, A., Hofmann, F., Mucke, C., Große, G., Van Rooijen, N., Kettenmann, H., Just, I., and Ahnert-Hilger, G. (2005). Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing. *Journal of neurochemistry* **95**, 1237-1248.
- Hong H., Zeng J.S., Kreulen D.L., Kaufman D.I., and Chen A.F. (2006). Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived super-oxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2210–2215.
- Honing, H., van den Berg, T. K., van der Pol, S. M., Dijkstra, C. D., van der Kammen, R. A., Collard, J. G., and de Vries, H. E. (2004). RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *Journal of leukocyte biology* **75**, 523-528.

- Hoogwerf, B. J. (2010). Renin–angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. *The American journal of cardiology* **105**, 30A-35A.
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., Gao, Y., and Chen, J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* **43**, 3063-3070.
- Hünnerkopf, R., Strobel, A., Gutknecht, L., Brocke, B., and Lesch, K. P. (2007). Interaction between BDNF Val66Met and dopamine transporter gene variation influences anxiety-related traits. *Neuropsychopharmacology* **32**, 2552-2560.
- Hunot, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., and Hirsch, E. (1996). Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* **72**, 355-363.
- Inagami, T., Iwai, N., Sasaki, K., Yamamo, Y., Bardhan, S., Chaki, S., Guo, D.-F., and Furuta, H. (1992). Cloning, expression and regulation of angiotensin II receptors. *Journal of hypertension* **10**, 713-716.
- Ishiwari, K., Mingote, S., Correa, M., Trevitt, J. T., Carlson, B. B., and Salamone, J. D. (2004). The GABA uptake inhibitor  $\beta$ -alanine reduces pilocarpine-induced tremor and increases extracellular GABA in substantia nigra pars reticulata as measured by microdialysis. *Journal of neuroscience methods* **140**, 39-46.
- Iwai, N., and Inagami, T. (1992). Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS letters* **298**, 257-260.
- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R. E., and Przedborski, S. (1995). Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* **4**, 257-269.
- Jackson, E., and Garrison, J. (1996). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*.
- Jalil, J., Lavandero, S., Chiong, M., and Paz Ocaranza, M. (2005). Rho/Rho kinase signal transduction pathway in cardiovascular disease and cardiovascular remodeling. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* **58**, 951-961.
- Jankovic, J., and Tolosa, E. (2007). "Parkinson's disease and movement disorders," Lippincott Williams & Wilkins.
- Jenkins, T. A., Mendelsohn, F. A., and Chai, S. Y. (1997). Angiotensin-Converting Enzyme Modulates Dopamine Turnover in the Striatum. *Journal of neurochemistry* **68**, 1304-1311.
- Jenner, P., Dexter, D., Sian, J., Schapira, A., and Marsden, C. (1992). Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Annals of neurology* **32**, S82-S87.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **53**, S26-S38.
- Jiménez-Jiménez, F., and Molina, J. (1997). [Neuroprotective and neurorestorative therapy in Parkinson's disease]. *Revista de neurologia* **25**, S185-93.
- Joglar, B., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Rey, P., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2009). The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *Journal of neurochemistry* **109**, 656-669.
- Johnson, M. E., and Bobrovskaya, L. (2014). An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *NeuroToxicology* **46**, 101-116.
- Jones, E. S., Vinh, A., McCarthy, C. A., Gaspari, T. A., and Widdop, R. E. (2008). AT< sub>



- 2<sup>nd</sup> receptors: Functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics* **120**, 292-316.
- Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., and Inagami, T. (1993). Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 24543-24546.
- Kang, J.-H., Asai, D., Tsuchiya, A., Mori, T., Niidome, T., and Katayama, Y. (2011). Peptide substrates for Rho-associated kinase 2 (Rho-kinase 2/ROCK2). *PloS one* **6**, e22699.
- Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A., and Negishi, M. (1998). p160 RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  induces neurite retraction. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 2489-2492.
- Keane, P., Kurzawa, M., Blain, P., and Morris, C. (2011). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease* **2011**.
- Kerr, D. S., Bevilacqua, L. R., Bonini, J. S., Rossato, J. I., Köhler, C. A., Medina, J. H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2005). Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology* **179**, 529-535.
- Khan, M. M., Kempuraj, D., Zaheer, S., Zaheer, A. (2014). Glia Maturation Factor Deficiency Suppresses 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Oxidative Stress in Astrocytes. *J Mol Neurosci*. **53**, 590-599.
- Kilbourn, R. G., Gross, S. S., Jubran, A., Adams, J., Griffith, O. W., Levi, R., and Lodato, R. F. (1990). NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 3629-3632.
- Kim, S. U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of neuroscience research* **81**, 302-313.
- Kirk, J. K. (1999). Angiotensin-II receptor antagonists: their place in therapy. *American family physician* **59**, 3140-3148.
- Kitamura, Y., Kosaka, T., Kakimura, J.-I., Matsuoka, Y., Kohno, Y., Nomura, Y., and Taniguchi, T. (1998). Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular pharmacology* **54**, 1046-1054.
- Klawans, H. L., Stein, R. W., Tanner, C. M., and Goetz, C. G. (1982). A pure parkinsonian syndrome following acute carbon monoxide intoxication. *Archives of neurology* **39**, 302-304.
- Knott, C., Stern, G., and Wilkin, G. (2000). Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and-2. *Molecular and Cellular Neuroscience* **16**, 724-739.
- Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y., and Oike, H. (2011). Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Molecular nutrition & food research* **55**, 530-540.
- Koch, J., Tönges, L., Barski, E., Michel, U., Bähr, M., and Lingor, P. (2014). ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell death & disease* **5**, e1225.
- Kochen, W., Kohlmüller, D., De Biasi, P., and Ramsay, R. (2003). The Endogeneous Formation of Highly Chlorinated Tetrahydro- $\beta$ -Carbolines as a Possible Causative Mechanism in Idiopathic Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol* **527**, 253-263.
- Komagome, R., Kimura, K., and Saito, M. (2000). Postnatal changes in Rho and Rho-related proteins in the mouse brain. *Japanese Journal of Veterinary Research* **47**, 127-133.

- Konings, C. H., Kuiper, M. A., Bergmans, P. L., Grijpma, A.-M., van Kamp, G. J., and Wolters, E. C. (1994). Increased angiotensin-converting enzyme activity in cerebrospinal fluid of treated patients with Parkinson's disease. *Clinica chimica acta* **231**, 101-106.
- Koutsilieri, E., Scheller, C., Grünblatt, E., Nara, K., Li, J., and Riederer, P. (2002). Free radicals in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* **249**, ii01-ii05.
- Kreider, T., Anthony, R. M., Urban, J. F., and Gause, W. C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current opinion in immunology* **19**, 448-453.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* **19**, 312-318.
- Krueger, G., and Callis, K. (2004). Potential of tumor necrosis factor inhibitors in psoriasis and psoriatic arthritis. *Archives of dermatology* **140**, 218-225.
- Kubo, T., Hata, K., Yamaguchi, A., and Yamashita, T. (2007). Rho-ROCK inhibitors as emerging strategies to promote nerve regeneration. *Current pharmaceutical design* **13**, 2493-2499.
- Kubo, T., and Yamashita, T. (2007). Rho-ROCK inhibitors for the treatment of CNS injury. *Recent patents on CNS drug discovery* **2**, 173-179.
- Kumar, A., Rassoli, A., and Raizada, M. (1988). Angiotensinogen gene expression in neuronal and glial cells in primary cultures of rat brain. *Journal of neuroscience research* **19**, 287-290.
- Kumar Kaushik, D., and Basu, A. (2013). A friend in need may not be a friend indeed: role of microglia in neurodegenerative diseases. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* **12**, 726-740.
- Kumar, R., Singh, V. P., and Baker, K. M. (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **18**, 208-214.
- Kumar, R., Singh, V. P., and Baker, K. M. (2009). The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Current hypertension reports* **11**, 104-110.
- Kushleika, J., Checkoway, H., Woods, J. S., Moon, J. D., Smith-Weller, T., Franklin, G. M., and Swanson, P. D. (1996). Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **39**, 378-381.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Pallares, J., Villar-Cheda, B., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., and Guerra, M. J. (2011). Aging, angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging and disease* **2**, 257.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Pallares, J., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., and Guerra, M. J. (2012). Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. *American journal of neurodegenerative disease* **1**, 226-244.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Pallares, J., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., and Rodríguez-Perez, A. I. (2013). Dopamine-Angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Movement Disorders* **28**, 1337-1342.
- Labandeira-García, J. L., Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Borrajo, A., and Rodríguez-Perez, A. I. (2014). Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy* **8**, 67.
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Villar-Cheda, B., Borrajo, A., Dominguez-Meijide, A., and Guerra, M. J. (2014). Rho Kinase and Dopaminergic Degeneration A Promising Therapeutic Target for Parkinson's Disease. *The Neuroscientist*, 1073858414554954.
- Lang, A. E. (2000). Surgery for Parkinson disease: a critical evaluation of the state of the art.

- Archives of neurology* **57**, 1118-1125.
- Langston, J., Forno, L., Tetud, J., Reeves, A., Kaplan, J., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of neurology* **46**, 598-605.
- Lau, C., O'shea, R., Broberg, B., Bischof, L., and Beart, P. (2011). The Rho kinase inhibitor Fasudil up-regulates astrocytic glutamate transport subsequent to actin remodelling in murine cultured astrocytes. *British journal of pharmacology* **163**, 533-545.
- Leal, M. C., Casabona, J. C., Puntel, M., and Pitossi, F. J. (2013). Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? *Frontiers in cellular neuroscience* **7**, 53.
- Lee, Y.-C., Lin, C.-H., Wu, R.-M., Lin, J.-W., Chang, C.-H., and Lai, M.-S. (2014). Antihypertensive agents and risk of Parkinson's disease: a nationwide cohort study.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., and McKerracher, L. (1999). Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *The Journal of neuroscience* **19**, 7537-7547.
- Levy, O. A., Malagelada, C., and Greene, L. A. (2009). Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis* **14**, 478-500.
- Lewis, S. J., Dove, A., Robbins, T. W., Barker, R. A., and Owen, A. M. (2003). Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. *The Journal of Neuroscience* **23**, 6351-6356.
- Li, J.-M., and Shah, A. M. (2003). Mechanism of Endothelial Cell NADPH Oxidase Activation by Angiotensin II role of the p47 phox subunit. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12094-12100.
- Lin, J.-J., Yueh, K.-C., Chang, D.-C., and Lin, S.-Z. (2002). Association between genetic polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* **199**, 25-29.
- Lindqvist, D., Hall, S., Surova, Y., Nielsen, H. M., Janelidze, S., Brundin, L., and Hansson, O. (2013). Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease—associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity* **33**, 183-189.
- Lindvall, O., and Björklund, A. (2004). Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* **1**, 382-393.
- Liu, B., Gao, H.-M., and Hong, J.-S. (2003). Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environmental health perspectives* **111**, 1065-1073.
- Liu, B. (2006). Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. *The AAPS journal* **8**, E606-E621.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies-integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Lopez-Real, A., Rey, P., Soto-Otero, R., MEndez-Alvarez, E., and Labandeira-Garcia, J. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. *Journal of neuroscience research* **81**, 865-873.
- Lorigados, L., Orozco, S., Morales, L., Estupiñán, B., García, I., and Rocha, L. (2013). Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biotechnología Aplicada* **30**, 9-16.
- Lucius, R., Gallinat, S., Rosenstiel, P., Herdegen, T., Sievers, J., and Unger, T. (1998). The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of



- adult rats. *The Journal of experimental medicine* **188**, 661-670.
- Lücking, C. B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B. S., Meco, G., Denèfle, P., and Wood, N. W. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *New England Journal of Medicine* **342**, 1560-1567.
- Lull, M. E., and Block, M. L. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* **7**, 354-365.
- Lynch, G., Kramar, E. A., Rex, C. S., Jia, Y., Chappas, D., Gall, C. M., and Simmons, D. A. (2007). Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *The Journal of neuroscience* **27**, 4424-4434.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* **25**, 677-686.
- Maries, E., Dass, B., Collier, T. J., Kordower, J. H., and Steece-Collier, K. (2003). The role of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 727-738.
- Martín-Cano, F. E., Dondeyne, M., Boesmans, W., Morais, V., De Strooper, B., Pozo, M. J., Berghe, P. V., and Berghe, P. V. (2013). Enteric neuronal function and colonic motility in PINK1-/-mice, a model for Parkinson's disease. *Bases celulares del envejecimiento en colon y páncreas. Papel del tratamiento con melatonina.*, 235. Tesis doctoral.
- Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., and Chilcote, T. (2005). Effects of  $\alpha$ -synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* **46**, 857-868.
- Mattson, M. P., and Maudsley, S. (2009). Live Longer sans the AT 1A Receptor. *Cell metabolism* **9**, 403-405.
- Maul, B., Krause, W., Pankow, K., Becker, M., Gembardt, F., Alenina, N., Walther, T., Bader, M., and Siems, W.-E. (2005). Central angiotensin II controls alcohol consumption via its AT1 receptor. *The FASEB journal* **19**, 1474-1481.
- Mauri, D. N., Ebner, R., Montgomery, R. I., Kochel, K. D., Cheung, T. C., Yu, G.-L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin  $\alpha$  are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* **8**, 21-30.
- McCann S.K. and Roulston C. L. (2013). NADPH Oxidase as a therapeutic target for neuroprotection against ischaemic stroke: future perspectives. *Brain Sci.* **3**, 561-598.
- McCoy, M. K., Ruhn, K. A., Blesch, A., and Tansey, M. G. (2011). TNF: a key neuroinflammatory mediator of neurotoxicity and neurodegeneration in models of Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol* **691**, 539-540.
- McCoy, M. K., and Tansey, M. G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* **5**, 45.
- McGeer P. L., Itagaki S., Boyes B.E. and McGeer E.G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285-1291.
- McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (2004). Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* **10**, S3-S7.
- McGuire, S. O., Ling, Z. D., Lipton, J. W., Sortwell, C. E., Collier, T. J., and Carvey, P. M. (2001). Tumor necrosis factor  $\alpha$  is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Experimental neurology* **169**, 219-230.

- McNaught, K. S. P., Mytilineou, C., JnoBaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jenner, P., and Olanow, C. W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *Journal of neurochemistry* **81**, 301-306.
- McNaught, K. S. P., and Olanow, C. W. (2003). Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of neurology* **53**, S73-S86.
- McNaught, K. S. P., Perl, D. P., Brownell, A. L., and Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of neurology* **56**, 149-162.
- McNaught, K. S. P., and Olanow, C. W. (2006). Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease. *Annals of neurology* **60**, 243-247.
- Mease, P. (2002). Tumour necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases* **61**, 298-304.
- Medelsohn, F. A., Jenkins, T. A., and Berkovic, S. F. (1993). Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain research* **613**, 221-229.
- Meredith, G. E., Sonsalla, P. K., and Chesselet, M.-F. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta neuropathologica* **115**, 385-398.
- Mertens, B., Massie, A., Michotte, Y., and Sarre, S. (2009a). Effect of nigrostriatal damage induced by 6-hydroxydopamine on the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the striatum of the rat. *Neuroscience* **162**, 148-154.
- Mertens, B., Vanderheyden, P., Michotte, Y., and Sarre, S. (2009b). The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **11**, 49-56.
- Meyer, A. K., Maisel, M., Hermann, A., Stirl, K., and Storch, A. (2010). Restorative approaches in Parkinson's Disease: Which cell type wins the race? *Journal of the neurological sciences* **289**, 93-103.
- Milsted, A., Barna, B. P., Ransohoff, R. M., Brosnihan, K. B., and Ferrario, C. M. (1990). Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 5720-5723.
- Miller, D. B., and O'Callaghan, J. P. (2014). Biomarkers of Parkinson's disease (PD): Present and future. *Metabolism* **64**, S40-S46.
- Mir, M., Tolosa, L., Asensio, V. J., Lladó, J., and Olmos, G. (2008). Complementary roles of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in inducible microglial nitric oxide generation. *Journal of neuroimmunology* **204**, 101-109.
- Miyasaki, J., Martin, W., Suchowersky, O., Weiner, W., and Lang, A. (2002). Parámetros de práctica clínica: inicio del tratamiento de la Enfermedad de Parkinson: una revisión basada en la evidencia. *American Academy of Neurology. Neurology* **58** (1), 11-17.
- Miyazaki, M., and Takai, S. (2006). Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *Journal of pharmacological sciences* **100**, 391-397.
- Mizuno, Y., Sone, N., Suzuki, K., and Saitoh, T. (1988). Studies on the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion MPP<sup>+</sup> against mitochondria of mouse brain. *Journal of the neurological sciences* **86**, 97-110.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1994). Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience letters* **165**, 208-210.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu,

- T. (1999a). Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters* **270**, 45-48.
- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K.-i., Ogawa, N., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (1999b). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF- $\alpha$  induction. *Neuroscience letters* **268**, 101-104.
- Molinuevo, J. L., Lladó, A., and Rami, L. (2005). Memantine: targeting glutamate excitotoxicity in Alzheimer's disease and other dementias. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* **20**, 77-85.
- Moon, M.-Y., Kim, H.-J., Li, Y., Kim, J.-G., Jeon, Y.-J., Won, H.-Y., Kim, J.-S., Kwon, H.-Y., Choi, I.-G., and Ro, E. (2013). Involvement of small GTPase RhoA in the regulation of superoxide production in BV2 cells in response to fibrillar A $\beta$  peptides. *Cellular signalling* **25**, 1861-1869.
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**, 57-87.
- Mueller, B. K., Mack, H., and Teusch, N. (2005). Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 387-398.
- Mukai, Y., Shimokawa, H., Matoba, T., Kandabashi, T., Satoh, S., Hiroki, J., Kaibuchi, K., and Takeshita, A. (2001). Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *The FASEB Journal* **15**, 1062-1064.
- Müller, T., Kuhn, W., Krüger, R., and Przuntek, H. (1998). "Selegiline as immunostimulant-a novel mechanism of action?,". *J Neural Transm Suppl* **52**, 321-328.
- Muñoz, A. M., Rey, P., Parga, J., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2005). Glial overexpression of heme oxygenase-1: a histochemical marker for early stages of striatal damage. *Journal of chemical neuroanatomy* **29**, 113-126.
- Muñoz, A. M., Rey, P., Soto-Otero, R., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2004). Systemic administration of N-acetylcysteine protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced degeneration. *Journal of neuroscience research* **76**, 551-562.
- Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R., and Labandeira-Garcia, J. L. (2006). Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology* **51**, 112-120.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (1999). Regulation of the Gene Encoding Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-[alpha]) in the Rat Brain and Pituitary in Response to Different Models of Systemic Immune Challenge. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **58**, 61-77.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A. (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **60**, 277-290.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., and Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS letters* **392**, 189-193.
- Nakajima, M., Mukoyama, M., Pratt, R. E., Horiuchi, M., and Dzau, V. J. (1993). Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **197**, 393-399.
- Nambu, A., Tokuno, H., and Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-

- subthalamo–pallidal ‘hyperdirect’ pathway. *Neuroscience research* **43**, 111-117.
- Namsolleck, P., Boato, F., Schwengel, K., Paulis, L., Matho, K. S., Geurts, N., Thöne-Reineke, C., Lucht, K., Seidel, K., and Hallberg, A. (2013). AT2-receptor stimulation enhances axonal plasticity after spinal cord injury by upregulating BDNF expression. *Neurobiology of disease* **51**, 177-191.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314-1318.
- Obeso, J. A., and Lanciego, J. L. (2011). Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia. *Frontiers in neuroanatomy* **5**, 39.
- Obeso, J. A., Marin, C., Rodríguez-Oroz, C., Blesa, J., Benítez-Temiño, B., Mena-Segovia, J., Rodríguez, M., and Olanow, C. W. (2008). The basal ganglia in Parkinson’s disease: current concepts and unexplained observations. *Annals of neurology* **64**, S30-S46.
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Rodríguez, M., Arbizu, J., and Giménez-Amaya, J. M. (2002). The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *Physiology* **17**, 51-55.
- Ogata, A., Tashiro, K., Nukuzuma, S., Nagashima, K., and Hall, W. W. (1997). A rat model of Parkinson’s disease induced by Japanese encephalitis virus. *Journal of neurovirology* **3**, 141-147.
- Ohtsu, H., Suzuki, H., Nakashima, H., Dhobale, S., Frank, G. D., Motley, E. D., and Eguchi, S. (2006). Angiotensin II Signal Transduction Through Small GTP-Binding Proteins Mechanism and Significance in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* **48**, 534-540.
- Olson, M. F. (2008). Applications for ROCK kinase inhibition. *Current opinion in cell biology* **20**, 242-248.
- Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., and Torizuka, T. (2005). Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson’s disease. *Annals of neurology* **57**, 168-175.
- Paintlia, A. S., Paintlia, M. K., Singh, A. K., and Singh, I. (2013). Modulation of Rho-Rock signaling pathway protects oligodendrocytes against cytokine toxicity via PPAR- $\alpha$ -dependent mechanism. *Glia* **61**, 1500-1517.
- Pan, H.-L. (2004). Brain angiotensin II and synaptic transmission. *The Neuroscientist* **10**, 422-431.
- Pan, P., Shen, M., Yu, H., Li, Y., Li, D., and Hou, T. (2013). Advances in the development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors. *Drug discovery today* **18**, 1323-1333.
- Pan, T., Rawal, P., Wu, Y., Xie, W., Jankovic, J., and Le, W. (2009). Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience* **164**, 541-551.
- Parga, J., Rodríguez-Pallares, J., Joglar, B., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M., and Labandeira-Garcia, J. (2010). Effect of inhibitors of NADPH oxidase complex and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels on generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *Developmental Dynamics* **239**, 3247-3259.
- Park, K. M., and Bowers, W. J. (2010). Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cellular signalling* **22**, 977-983.
- Pasternak, B., Svanström, H., Nielsen, N. M., Fugger, L., Melbye, M., and Hviid, A. (2012). Use of calcium channel blockers and Parkinson’s disease. *American journal of epidemiology* **175**, 627-635.
- Paul, M., Mehr, A. P., and Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews* **86**, 747-803.

- Paxinos G., and Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press.
- Peterson, L. J., and Flood, P. M. (2012). Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators of inflammation* **2012**.
- Pfaffl, MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Phillips, M. I., and De Oliveira, E. M. (2008). Brain renin angiotensin in disease. *Journal of molecular medicine* **86**, 715-722.
- Pienaar, I. S., Götz, J., and Feany, M. B. (2010). Parkinson's disease: insights from non-traditional model organisms. *Progress in neurobiology* **92**, 558-571.
- Pivovarova, N. B., and Andrews, S. B. (2010). Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *Febs Journal* **277**, 3622-3636.
- Pondal, M., Del Ser, T., and Bermejo, F. (1996). Anticholinergic therapy and dementia in patients with Parkinson's disease. *Journal of neurology* **243**, 543-546.
- Przedborski, S., and Ischiropoulos, H. (2005). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling* **7**, 685-693.
- Qin, L., Liu, Y., Wang, T., Wei, S.-J., Block, M. L., Wilson, B., Liu, B., and Hong, J.-S. (2004). NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 1415-1421.
- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J., and Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* **55**, 453-462.
- Qian, L., Flood, P. M., and Hong, J.-S. (2010). Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *Journal of neural transmission* **117**, 971-979.
- Qin, L., Liu, Y., Hong, J. S., and Crews, F. T. (2013). NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia* **61**, 855-868.
- Quinlan, J. T., and Phillips, M. I. (1981). Immunoreactivity for an angiotensin II-like peptide in the human brain. *Brain research* **205**, 212-218.
- Quinzii, C. M., López, L. C., Von-Moltke, J., Naini, A., Krishna, S., Schuelke, M., Salvati, L., Navas, P., DiMauro, S., and Hirano, M. (2008). Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *The FASEB Journal* **22**, 1874-1885.
- Ravina, B., Fagan, S., Hart, R., Hovinga, C., Murphy, D., Dawson, T., and Marler, J. (2003). Neuroprotective agents for clinical trials in Parkinson's disease A systematic assessment. *Neurology* **60**, 1234-1240.
- Ray, R., and Shah, A. x. a. m. (2005). NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science* **109**, 217-226.
- Re, R. N. (2004). Tissue renin angiotensin systems. *Medical Clinics of North America* **88**, 19-38.
- Reardon, K., Mendelsohn, F., Chai, S., and Horne, M. (2000). The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of Parkinson's disease. *Australian and New Zealand journal of medicine* **30**, 48-53.
- Rey, P., Lopez-Real, A., Sanchez-Iglesias, S., Muñoz, A., Soto-Otero, R., and Labandeira-Garcia, J. (2007). Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine



- toxicity for dopaminergic neurons. *Neurobiology of aging* **28**, 555-567.
- Riento, K., and Ridley, A. J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**, 446-456.
- Righi, M., Mori, L., Libero, G. D., Sironi, M., Biondi, A., Mantovani, A., Donini, S. D., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1989). Monokine production by microglial cell clones. *European journal of immunology* **19**, 1443-1448.
- Rodríguez-Hernández, Á., Cordero, M. D., Salvati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., Gomez Izquierdo, L., Cotán, D., Navas, P., and Sánchez-Alcázar, J. A. (2009). Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* **5**, 19-32.
- Rodríguez-Pallares, J., Quiroz, C., Parga, J., Guerra, M., and Labandeira-Garcia, J. (2004). Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *European journal of neuroscience* **20**, 1489-1498.
- Rodríguez-Pallares, J., Parga, J., Munoz, A., Rey, P., Guerra, M., and Labandeira-Garcia, J. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of neurochemistry* **103**, 145-156.
- Rodríguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J., Muñoz, A., Guerra, M., and Labandeira-Garcia, J. (2008). Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiology of disease* **31**, 58-73.
- Rodríguez-Pallares, J., Parga, J., Joglar, B., Guerra, M., and Labandeira-Garcia, J. (2009). The mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker 5-hydroxydecanoate inhibits toxicity of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons. *Neurotoxicity research* **15**, 82-95.
- Rodríguez-Pallares, J., Joglar, B., Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Toledo-Aral, J. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2012a). Cografting of carotid body cells improves the long-term survival, fiber outgrowth and functional effects of grafted dopaminergic neurons. *Regenerative medicine* **7**, 309-322.
- Rodríguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2012b). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. Relevance for aging-associated susceptibility to Parkinson's disease. *Age* **34**, 863-880.
- Rodríguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., Lanciego, J. L., and Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease. *Experimental neurology* **224**, 517-526.
- Rodríguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Joglar, B., Garrido-Gil, P., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2011). Renin angiotensin system and gender differences in dopaminergic degeneration. *Mol Neurodegener* **6**, 58.
- Rodríguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Dopaminergic neuroprotection of hormonal replacement therapy in young and aged menopausal rats: role of the brain angiotensin system. *Brain* **135**, 124-138.
- Rodríguez-Perez, A. I., Dominguez-Meijide, A., Lanciego, J. L., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2013a). Dopaminergic degeneration is enhanced by chronic brain hypoperfusion and inhibited by angiotensin receptor blockage. *Age* **35**, 1675-1690.
- Rodríguez-Perez, A. I., Dominguez-Meijide, A., Lanciego, J. L., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2013b). Inhibition of Rho kinase mediates the neuroprotective effects of

- estrogen in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* **58**, 209-219.
- Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2015). Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation. *Glia* **63**, 466-482.
- Rodriguez, M., Obeso, J., and Olanow, C. W. (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in parkinson's disease: A target for neuroprotection. *Annals of neurology* **44**, S175-S188.
- Rojo, A. I., McBean, G., Cindric, M., Egea, J., López, M. G., Rada, P., Zarkovic, N., and Cuadrado, A. (2014). Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance. *Antioxidants & redox signaling* **21**, 1766-1801.
- Rueckschloss, U., Quinn, M. T., Holtz, J., and Morawietz, H. (2002). Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **22**, 1845-1851.
- Saab, Y. B., Gard, P. R., Yeoman, M. S., Mfarrej, B., El-Moalem, H., and Ingram, M. J. (2007). Renin-angiotensin-system gene polymorphisms and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **31**, 1113-1118.
- Saavedra, J. M. (2005). Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cellular and molecular neurobiology* **25**, 485-512.
- Saavedra, J. M., Sánchez-Lemus, E., and Benicky, J. (2011). Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology* **36**, 1-18.
- Sánchez-Iglesias, S., Rey, P., Méndez-Álvarez, E., Labandeira-García, J. L., and Soto-Otero, R. (2007). Time-course of brain oxidative damage caused by intrastratial administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochemical research* **32**, 99-105.
- Sanchez, B., Lopez-Martin, E., Segura, C., Labandeira-Garcia, J. L., and Perez-Fernandez, R. (2002a). 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases striatal GDNF mRNA and protein expression in adult rats. *Molecular brain research* **108**, 143-146.
- Sanchez, B., Lopez-Martin, E., Segura, C., Labandeira-Garcia, J. L., and Perez-Fernandez, R. (2002b). 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases striatal GDNF mRNA and protein expression in adult rats. *Molecular brain research* **108**, 143-146.
- Sandyk, R. (1985). Parkinsonism induced by captopril. *Clinical neuropharmacology* **8**, 197.
- Sawada, H., Shimohama, S., Kawamura, T., Akaike, A., Kitamura, Y., Taniguchi, T., and Kimura, J. (1996). Mechanism of resistance to NO-induced neurotoxicity in cultured rat dopaminergic neurons. *Journal of neuroscience research* **46**, 509-518.
- Scalzo, P., Kümmer, A., Cardoso, F., and Teixeira, A. L. (2009). Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology* **216**, 122-125.
- Schmandke, A., Schmandke, A., and Strittmatter, S. M. (2007). ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *The Neuroscientist* **13**, 454-469.
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research* **318**, 215-224.
- Schweizer, U., Bräuer, A. U., Köhrle, J., Nitsch, R., and Savaskan, N. E. (2004). Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Research Reviews* **45**, 164-178.

- Seltzer, A., Bregonzio, C., Armando, I., Baiardi, G., and Saavedra, J. M. (2004). Oral administration of an AT<sub>1</sub> receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain research* **1028**, 9-18.
- Sen, C. K., and Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB journal* **10**, 709-720.
- Senokuchi, T., Matsumura, T., Sakai, M., Yano, M., Taguchi, T., Matsuo, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Imoto, K., and Nishikawa, T. (2005). Statins suppress oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation by inactivation of the small G protein-p38 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 6627-6633.
- Sheikh, A. M., Nagai, A., Ryu, J. K., McLarnon, J. G., Kim, S. U., and Masuda, J. (2009). Lysophosphatidylcholine induces glial cell activation: role of rho kinase. *Glia* **57**, 898-907.
- Shimohama, S., Sawada, H., Kitamura, Y., and Taniguchi, T. (2003). Disease model: Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine* **9**, 360-365.
- Shin, H. K., Salomone, S., and Ayata, C. (2008). Targeting cerebrovascular Rho-kinase in stroke. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 1547-1564.
- Shohami E., Ginis I., Hallenbeck JM. (1999). Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **10**: 119-30.
- Singh, C., Ahmad, I., and Kumar, A. (2006). Pesticides and metals induced Parkinson's disease: involvement of free radicals and oxidative stress. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* **53**, 19-28.
- Singh, N., Pillay, V., and Choonara, Y. E. (2007). Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* **81**, 29-44.
- Soto-Otero, R., Méndez-Álvarez, E. a., Hermida-Ameijeiras, Á., López-Real, A. M. a., and Labandeira-García, J. L. (2002). Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochemical pharmacology* **64**, 125-135.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997).  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840.
- Sriram, K., Matheson, J. M., Benkovic, S. A., Miller, D. B., Luster, M. I., and O'Callaghan, J. P. (2002). Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *The FASEB Journal* **16**, 1474-1476.
- Sriram, K., Matheson, J. M., Benkovic, S. A., Miller, D. B., Luster, M. I., and O'Callaghan, J. P. (2006). Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- $\alpha$ . *The FASEB Journal* **20**, 670-682.
- St P McNaught, K., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., and Olanow, C. W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Experimental neurology* **179**, 38-46.
- Steinberg, J. (1998). Angiotensin II receptor antagonists: mechanisms and therapeutic utility. *Hospital Pharmacy* **33**, 53-65.
- Stornetta, R. L., Hawelu-Johnson, C. L., Guyenet, P. G., and Lynch, K. R. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* **242**, 1444-1446.
- Streit, W. J., Walter, S. A., and Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Progress in neurobiology* **57**, 563-581.
- Strittmatter, S., Thiele, E., Kapiloff, M., and Snyder, S. (1985). A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates.

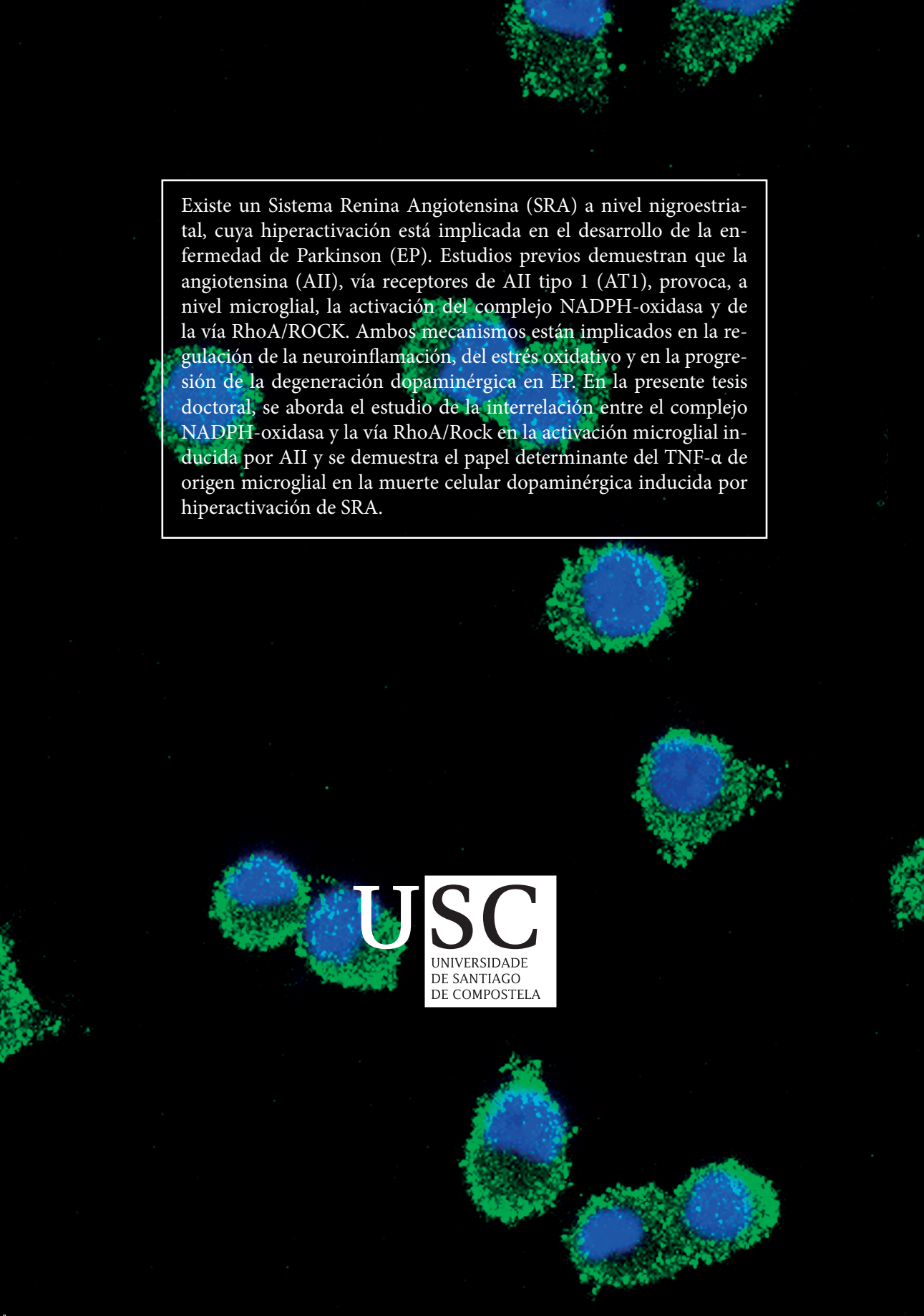


- Journal of Biological Chemistry* **260**, 9825-9832.
- Tansey, M. G., McCoy, M. K., and Frank-Cannon, T. C. (2007). Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology* **208**, 1-25.
- Tarabin, V., and Schwaninger, M. (2004). The role of NF- $\kappa$ B in 6-hydroxydopamine- and TNF $\alpha$ -induced apoptosis of PC12 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **369**, 563-569.
- Tatton, W., and Greenwood, C. (1991). Rescue of dying neurons: a new action for deprenyl in MPTP parkinsonism. *Journal of neuroscience research* **30**, 666-672.
- Tatton, W. (1996). Modulation of gene expression rather than monoamine oxidase inhibition (-)-Deprenyl-related compounds in controlling neurodegeneration. *Neurology* **47**, 171S-183S.
- Thiffault, C., Aumont, N., Quirion, R., and Poirier, J. (1995). Effect of MPTP and l-Deprenyl on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation Levels in Mouse Brain. *Journal of neurochemistry* **65**, 2725-2733.
- Thomas, B., and Beal, M. F. (2011). Molecular insights into Parkinson's disease. *F1000 medicine reports* **3**, 7.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* **4**, 346-358.
- Thomas, W. G., Greenland, K. J., Shinkel, T. A., and Sernia, C. (1992). Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures. *Brain research* **588**, 191-200.
- Tigerstedt, R., and Bergman P.G. (1898). Niere und kreislauf. *Scand Arch Physiol* **8**, 223-271.
- Tönges, L., Frank, T., Tatenhorst, L., Saal, K. A., Koch, J. C., Szegő, É. M., Bähr, M., Weishaupt, J. H., and Lingor, P. (2012). Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain* **135**, 3355-3370.
- Tönges, L., Günther, R., Suhr, M., Jansen, J., Balck, A., Saal, K. A., Barski, E., Nientied, T., Götz, A. A., and Koch, J. C. (2014). Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* **62**, 217-232.
- Touyz, R. M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M. T., Pagano, P. J., and Schiffrin, E. L. (2002). Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD (P) H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries regulation by angiotensin II. *Circulation research* **90**, 1205-1213.
- Tsai, Y.-R., Wang, Y.-J., Lee, M.-R., Hsu, M.-F., and Wang, J.-P. (2013). p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways are not essential regulators of formyl peptide-stimulated p47 phox activation in neutrophils. *European journal of pharmacology* **701**, 96-105.
- Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1660**, 171-199.
- und Halbach, O. v. B. (2005). Animal models of Parkinson's Disease. *Neurodegenerative Dis* **2**, 313-320.
- und Halbach, O. v. B., and Albrecht, D. (2006). The CNS renin-angiotensin system. *Cell and tissue research* **326**, 599-616.
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of  $\alpha$ -synuclein aggregation. *Journal of neurochemistry* **103**, 17-37.
- Valenzuela, R., Barroso-Chinea, P., Villar-Cheda, B., Joglar, B., Muñoz, A., Lanciego, J. L., and Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Location of prorenin receptors in primate substantia

- nigra: effects on dopaminergic cell death. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **69**, 1130-1142.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & development* **11**, 2295-2322.
- Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., and Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American journal of epidemiology* **157**, 1015-1022.
- Varani, K., Vincenzi, F., Tosi, A., Gessi, S., Casetta, I., Granieri, G., Fazio, P., Leung, E., MacLennan, S., and Granieri, E. (2010). A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF- $\alpha$  levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. *The FASEB journal* **24**, 587-598.
- Varnum, M. M., and Ikezu, T. (2012). The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **60**, 251-266.
- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guégan, C., Teismann, P., Choi, D.-K., Tieu, K., and Przedborski, S. (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Current opinion in neurology* **14**, 483-489.
- Villar-Cheda, B., Sousa-Ribeiro, D., Rodríguez-Pallares, J., Rodríguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2008). Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **29**, 230-234.
- Villar-Cheda, B., Rodríguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Muñoz, A., Guerra, M. J., Baltatu, O. C., and Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* **32**, 1695-1706.
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Joglar, B., Rodríguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2012a). Involvement of microglial RhoA/Rho-Kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. *Neurobiology of disease* **47**, 268-279.
- Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., Rodríguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., and Labandeira-Garcia, J. L. (2012b). Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiology of aging* **33**, 204. e1-204. e11.
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R., and Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiology of aging* **35**, 1726-1738.
- Vivekanantham, S., Shah, S., Dewji, R., Dewji, A., Khatri, C., and Ologunde, R. (2014). Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair. *International Journal of Neuroscience* **125**, 717-725.
- Vowinckel, E., Reutens, D., Becher, B., Verge, G., Evans, A., Owens, T., and Antel, J. P. (1997). PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research* **50**, 345-353.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation* **10**, 45-65.
- Walter, B. L., and Vitek, J. L. (2004). Surgical treatment for Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* **3**, 719-728.

- Wang, X.-J., Zhang, S., Yan, Z.-Q., Zhao, Y.-X., Zhou, H.-Y., Wang, Y., Lu, G.-Q., and Zhang, J.-D. (2011). Impaired CD200–CD200R-mediated microglia silencing enhances midbrain dopaminergic neurodegeneration: roles of aging, superoxide, NADPH oxidase, and p38 MAPK. *Free Radical Biology and Medicine* **50**, 1094-1106.
- Wilfried, K., Müller, T., Krüger, R., and Horst, P. (1996). Selegiline stimulates biosynthesis of cytokines interleukin-1 beta and interleukin-6. *Neuroreport* **7**, 2847-2848.
- Wilms, H., Zecca, L., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., and Lucius, R. (2007). Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Current pharmaceutical design* **13**, 1925-1928.
- Wright, J. W., and Harding, J. W. (2012). Importance of the brain angiotensin system in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease* **2012**.
- Wright, J. W., Kawas, L. H., and Harding, J. W. (2013). A role for the brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Frontiers in endocrinology* **4**, 158.
- Wu, D.-C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6145-6150.
- Wu, J., Li, J., Hu, H., Liu, P., Fang, Y., and Wu, D. (2012). Rho-kinase inhibitor, fasudil, prevents neuronal apoptosis via the Akt activation and PTEN inactivation in the ischemic penumbra of rat brain. *Cellular and molecular neurobiology* **32**, 1187-1197.
- Wu, S. S., and Frucht, S. J. (2005). Treatment of Parkinson's Disease. *CNS drugs* **19**, 723-743.
- Wu, Y. R., Feng, I., Lyu, R. K., Chang, K. H., Lin, Y. Y., Chan, H., Hu, F. J., Lee-Chen, G. J., and Chen, C. M. (2007). Tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism is associated with the risk of Parkinson's disease. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* **144**, 300-304.
- Yamagata, K., Ichinose, S., Miyashita, A., and Tagami, M. (2008). Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Neuroscience* **153**, 428-435.
- Yamamori, T., Inanami, O., Sumimoto, H., Akasaki, T., Nagahata, H., and Kuwabara, M. (2002). Relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and small GTPase Rac for the activation of NADPH oxidase in bovine neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications* **293**, 1571-1578.
- Yamamoto, N., Sawada, H., Izumi, Y., Kume, T., Katsuki, H., Shimohama, S., and Akaike, A. (2007). Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress relevance to parkinson disease. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 4364-4372.
- Yan, J., Zhou, X., Guo, J. J., Mao, L., Wang, Y. J., Sun, J., Sun, L. X., Zhang, L. Y., Zhou, X. F., and Liao, H. (2012). Nogo-66 inhibits adhesion and migration of microglia via GTPase Rho pathway in vitro. *Journal of neurochemistry* **120**, 721-731.
- Yasuhara, T., Shingo, T., and Date, I. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease. *Acta Medica Okayama* **61**, 51-56.
- Yuan, H., Zheng, J.-C., Liu, P., Zhang, S.-F., Xu, J.-Y., and Bai, L.-M. (2007). Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. *Neuroscience bulletin* **23**, 125-130.
- Zalcman, S., Green-Johnson, J. M., Murray, L., Nance, D. M., Dyck, D., Anisman, H., and Greenberg, A. H. (1994). Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain research* **643**, 40-49.

- Zawada, W. M., Banninger, G. P., Thornton, J., Marriott, B., Cantu, D., Rachubinski, A. L., Das, M., Griffin, W., and Jones, S. M. (2011). Generation of reactive oxygen species in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) treated dopaminergic neurons occurs as an NADPH oxidase-dependent two-wave cascade. *J Neuroinflammation* **8**, 129.
- Zeng, X., Chen, J., Deng, X., Liu, Y., Rao, M. S., Cadet, J.-L., and Freed, W. J. (2006). An In Vitro Model of Human Dopaminergic Neurons Derived from Embryonic Stem Cells: MPP+ Toxicity and GDNF Neuroprotection. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2708-2715.
- Zhang, H., Li, Y., Yu, J., Guo, M., Meng, J., Liu, C., Xie, Y., Feng, L., Xiao, B., and Ma, C. (2013). Rho kinase inhibitor fasudil regulates microglia polarization and function. *Neuroimmunomodulation* **20**, 313-322.
- Zhang, Y., Gu, X., and Yuan, X. (2007). Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. *European Journal of Neuroscience* **25**, 1341-1348.
- Zhang, Z., Fauser, U., and Schluesener, H. J. (2008). Dexamethasone suppresses infiltration of RhoA+ cells into early lesions of rat traumatic brain injury. *Acta neuropathologica* **115**, 335-343.
- Zhou, Z., Connell, M. C., and MacEwan, D. J. (2007). TNFR1-induced NF- $\kappa$ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cellular signalling* **19**, 1238-1248.
- Zhou, Z., Kim, J., Insolera, R., Peng, X., Fink, D. J., and Mata, M. (2011). Rho GTPase regulation of  $\alpha$ -synuclein and VMAT2: Implications for pathogenesis of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* **48**, 29-37.



Existe un Sistema Renina Angiotensina (SRA) a nivel nigroestriatal, cuya hiperactivación está implicada en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (EP). Estudios previos demuestran que la angiotensina (AII), vía receptores de AII tipo 1 (AT1), provoca, a nivel microglial, la activación del complejo NADPH-oxidasa y de la vía RhoA/ROCK. Ambos mecanismos están implicados en la regulación de la neuroinflamación, del estrés oxidativo y en la progresión de la degeneración dopaminérgica en EP. En la presente tesis doctoral, se aborda el estudio de la interrelación entre el complejo NADPH-oxidasa y la vía RhoA/Rock en la activación microglial inducida por AII y se demuestra el papel determinante del TNF- $\alpha$  de origen microglial en la muerte celular dopaminérgica inducida por hiperactivación de SRA.

USC

UNIVERSIDADE  
DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA